



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 13/00, C12N 15/86, 15/40 A61K 39/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/02548
			(43) Date de publication internationale: 20 février 1992 (20.02.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00432		(74) Mandataire: POLUS, Camille; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).	
(22) Date de dépôt international: 30 mai 1991 (30.05.91)			
(30) Données relatives à la priorité: 90/10263 10 août 1990 (10.08.90) FR		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BJ (brevet OAPI), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CI (brevet OAPI), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), GN (brevet OAPI), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DESPRES, Philippe [FR/FR]; 22, rue Alsace-Lorraine, F-92250 La Garenne-Colombe (FR). BOULOY, Michèle [FR/FR]; 44, rue Olivier-de-Serres, F-75015 Paris (FR). GIRARD, Marc [FR/FR]; 6, rue César-Franck, F-75015 Paris (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	

(54) Title: RECOMBINANT BACULOVIRUS EXPRESSING PROTEINS E AND NSI OF FLAVIVIRIDAE VIRUSES AND FLAVIVIRIDAE-RELATED VIRUSES

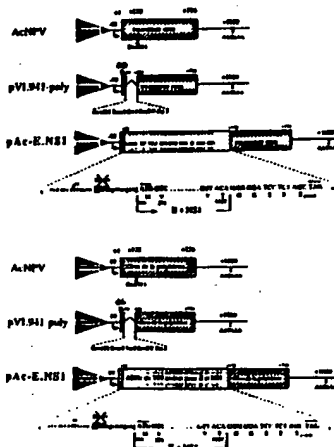
(54) Titre: BACULOVIRUS RECOMBINANT EXPRIMANT LES PROTEINS E ET NSI DE VIRUS APPARTENANT AUX FLAVIVIRIDAE OU DE VIRUS APPARENTES AUX FLAVIVIRIDAE

(57) Abstract

A recombinant baculovirus comprises a cDNA coding for all or part of antigenic envelope protein E and/or a cDNA coding for all or part of non-structural antigenic protein NSI of a virus belonging to *Flaviviridae* or a virus related thereto, and is inserted into the polyhedrin gene between nucleotide + 35 and nucleotide + 170 with the A of the polyhedrin's modified start codon having number + 1. Polypeptides obtained by means of this baculovirus, and the diagnostic and therapeutical uses thereof, are also described.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet un baculovirus recombinant, caractérisé en ce qu'il comporte un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine antigénique d'enveloppe E et/ou un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine antigénique non structurale NSI d'un virus appartenant aux *Flaviviridae* ou d'un virus apparenté aux *Flaviviridae*, inséré dans le gène de la polyédrine entre le nucléotide + 35 et le nucléotide de + 170, le A du codon d'initiation modifié de la polyédrine étant numéroté + 1, les polypeptides obtenus grâce à ce baculovirus ainsi que leurs applications diagnostiques et thérapeutiques.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brsil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

⁺ On ignore encore pour quels Etats de l'ancienne Union soviétique une désignation de l'Union soviétique déploie ses effets.

**BACULOVIRUS RECOMBINANT EXPRIMANT LES PROTEINES E ET NS1 DE
VIRUS APPARTENANT AUX FLAVIVIRIDAE OU DE VIRUS APPARENTES AUX
FLAVIVIRIDAE**

La présente invention se rapporte à un baculovirus recombinant exprimant les protéines E et NS1 de virus appartenant aux Flaviviridae ou de virus apparentés aux Flaviviridae (Flavi-like).

5 Par Flaviviridae, on entend la famille de virus décrite par WESTAWAY et coll. dans Intervirology 24 : 183-192 (1985) comprenant le genre Flavivirus dont le représentant type est le virus de la fièvre jaune (VFJ).

10 Par virus apparentés aux Flaviviridae, on entend les Pestivirus (Marc S. Collett et coll, J. Gen. Vir (1989) 70, 253-266), notamment le virus de la diarrhée virale des bovins (BVDV), le virus du choléra porcin (HCV), le virus de la border disease des moutons (BDV), ainsi que le virus de l'hépatite C (Roger H. Miller dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87 pp. 2057-2061, Mars 1990).

20 Le VFJ est un virus enveloppé contenant un génome composé d'un ARN monocaténaire de polarité positive de 10862 bases. L'ARN viral est le seul ARNm synthétisé pendant le cycle de replication (DESPRES et coll, (17)). Les séquences nucléotidiques complètes de 3 souches de VJF ont été déterminées (Rice et coll, (18), Desprès et coll, (19), Hahn et coll, (20), Dupuy et coll, (21)). L'analyse des séquences a révélé la présence d'un cadre de lecture unique ouvert de 10233 bases codant pour une polyprotéine de 3411 acides aminés (PM approximatif de 375 kDa). L'ordre des protéines sur le génome viral : 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' a été déduit d'après les données
25 30 concernant les séquences nucléiques et peptidiques, chacune des protéines matures étant générés après clivages co et post-traductionnels par les protéases virales et cellulaires.

La protéine d'enveloppe E (poids moléculaire

apparent de 54 kDa) présente à la surface des virions est l'antigène le plus important; elle consiste en une protéine intégrée dans les membranes qui se lie aux récepteurs cellulaires et induit des anticorps neutralisants.

La glycoprotéine non structurale NS1 (poids moléculaire apparent de 48 kDa) de fonction indéterminée pourrait jouer un rôle dans l'assemblage et la maturation du virus. L'immunisation avec la protéine NS1 purifiée ou des fragments polypeptidiques de NS1 exprimés sous formes de protéines de fusion par des bactéries s'est avérée protéger des souris et des primates contre une épreuve avec le VFJ. En outre, plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques de NS1 du VFJ possèdent une activité cytolytique en présence du complément et se sont montrés capables de protéger de manière passive des animaux d'une épreuve avec le virus infectieux homologue (Schesinger et coll, 1985 (1); Gould et coll, 1986 (2)).

Ces données suggèrent fortement que dans la prévention d'une infection virale, la reconnaissance immunitaire de la protéine NS1 pourrait fournir une alternative à la neutralisation directe des flavivirus.

On a cherché depuis un certain temps à provoquer une réponse immunitaire en injectant à des animaux des protéines immunogènes de ces virus produites par un vecteur approprié, notamment la protéine d'enveloppe (E) et la glycoprotéine non-structurale (NS1) connue pour conférer une bonne protection.

ZHAO et coll. (Journal of Virology, dec. 1987, p. 4019-4022, vol. 61 n° 12) ont ainsi décrit l'expression des protéines structurales et non structurales du virus de la Dengue par un virus recombinant de la vaccine.

Yi-Ming Zhang et coll, (Journal of Virology, août 1988, p 3027-3031, vol. 62, N° 8) ont décrit l'expression des protéines de structure C (capside), PreM (précurseur de M) et de la glycoprotéine de structure E (enveloppe) ainsi que de protéines non structurales NS1 et NS2A par un baculovirus recombinant.

Cependant, bien que les animaux immunisés soient protégés contre le virus de la Dengue, aucune de ces technique n'a permis d'obtenir un titre d'anticorps suffisamment élevé.

La présente invention a pour but de fournir un système d'expression des protéines immunogènes de Flaviviridae et virus apparentés aux Flaviviridae à un taux élevé, de manière à conférer une protection immunologique efficace contre les infections dues à ces virus.

La présente invention a pour objet un baculovirus recombinant, caractérisé en ce qu'il comporte un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine antigénique d'enveloppe E et/ou un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine antigénique non structurale NS1 d'un virus appartenant aux Flaviviridae ou d'un virus apparenté aux Flaviviridae, inséré dans le gène de la polyédrine entre le nucléotide + 35 et le nucléotide de + 170, le A du codon d'initiation modifié de la polyédrine étant numéroté + 1.

Lorsque le baculovirus recombinant comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou partie de E ou un ADNc codant pour tout ou partie de E et NS1, il comporte, en outre, en amont de l'ADNc une séquence leader qui correspond à l'extrémité 3' de la région 5' non codante du gène de la protéine VP1 du virus SV40 comportant 11 nucléotides en 3' du site Hind III (nt 1488 sur le génome de SV40)

et le codon d'initiation ATG de la protéine VP1.

5 Lorsque le baculovirus recombinant comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou partie de NS1, aucun codon d'initiation n'a été introduit artificiellement car le peptide signal de NS1 contient un nombre important d'ATG en phase; l'un au moins de ces derniers sert à initier la traduction.

10 Dans le cas où le baculovirus recombinant comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou partie de E, un codon de terminaison est présent à l'extrémité 3'. Il a été introduit dans une étape préalable à l'insertion dans le vecteur baculovirus.

15 Dans le cas où le baculovirus recombinant comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou partie de E qui inclut déjà un codon de terminaison, il n'est pas nécessaire qu'il comporte un codon de terminaison ajouté artificiellement.

20 Les baculovirus recombinants selon l'invention comportant respectivement un ADNc codant pour tout ou partie des protéines E et NS1, un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine E et un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine NS1, sont obtenus par cotransfection et recombinaison homologue des plasmides comportant en tant que segments d'insertion les ADNc respectifs avec le génome du baculovirus Autographa California Nuclear Polyhedrosis (AcNPV) de type sauvage.

30 Avantageusement, le virus appartenant aux Flaviviridae ou apparenté aux Flaviviridae est le virus de la fièvre jaune.

Un plasmide recombinant préféré, dénommé pAc-E-NS1 comprenant l'ADNc codant pour E et NS1 délé-tée de l'acide aminé C terminal potentiel de NS1, est

avantageusement obtenu par les étapes suivantes :

5 a) digestion d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour E et NS1, afin d'introduire un codon de terminaison à l'extrémité carboxylique de NS1. Il en résulte que la protéine exprimée est délétée de son aminoacide C-terminal;

b) digestion de ce plasmide par Hind III ou Bgl II;

10 c) traitement des extrémités avec le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate, de manière à rendre les extrémités franches;

d) digestion des ADN obtenus par Apa I;

15 e) isolement et ligation des fragments d'ADN obtenus avec le plasmide pVL-941 poly préalablement linéarisé avec Bam HI et traité par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate, puis par la phosphatase alcaline, pour générer un plasmide comportant l'ATG initiateur de la protéine
20 VP1 du virus SV40 précédé des 11 nucléotides adjacents en 5' délimités par un site Hind III. Cette séquence constitue une partie de région 5' non codante du ARNm chimérique polyédrine-VFJ, permettant l'expression de E et NS1. La région 3' de l'insérat code pour la
25 protéine NS1 où le dernier aminoacide C terminal est délété et remplacé par la séquence exogène G-G-S-S.

Un autre plasmide recombinant préféré, dénommé pAc-NS1 comprenant l'ADNc codant pour NS1 délété de son aminoacide C terminal potentiel est
30 avantageusement obtenu par les étapes suivantes :

a) digestion d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour E et NS1 délétée de son aminoacide C terminal avec Xba I;

b) remplissage avec le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate et

ligation des fragments obtenus pour générer un plasmide comportant une séquence leader correspondant à l'extrémité 3' de la région 5' non codante du gène de la protéine VP1 du virus SV 40 comportant les 11 nucléotides en 3' du site Hind III et le codon d'initiation ATG de la protéine VP1 ainsi que la séquence exogène GGG GGA TCC TCT AGC TAG en aval de l'ADNc codant pour E et NS1 délétée de son aminoacide C terminal;

5 c) digestion du plasmide obtenu à l'étape b) avec Tth III I, MluI et Pst I,

10 d) ligation des fragments obtenus à l'étape c) après remplissage du site Tth IIII par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate avec un vecteur de transfert pVL-941 poly obtenu à partir de pVL 941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI digéré par BamHI et remplissage du site Bam HI par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate.

20 Un autre plasmide recombinant préféré, dénommé pAc-E1 comprenant l'ADNc codant pour le peptide signal de la protéine E suivie de la protéine E délétée de son extrémité C terminale (aminoacides 286 à 720) est obtenu par les étapes suivantes :

25 a) digestion du plasmide pAc-E.NS1 décrit précédemment par Xho I et Apa I et d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour la protéine E avec Apa I et Bgl II, et

30 b) ligation des fragments [Xho I - Apa I] du plasmide pAc-E NS1 obtenu précédemment et [Apa I - Bgl II] du plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour la protéine E tronquée avec un vecteur de transfert PVL-941 poly obtenu à partir de pVL 941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI et digéré par Xho I et Bam H I.

Un autre plasmide recombinant préféré, dénommé pAc-E2 comprenant l'ADNc codant pour le peptide signal de la protéine E suivie de la protéine E deletée de son extrémité carboxylique contenant son domaine d'ancrage transmembranaire (aminoacides 286 à 720) est obtenu par les étapes suivantes:

a) création de sites Bam HI et Sma I aux extrémités des régions non codantes 5' et 3' respectivement de l'ADNc par mutagénèse dirigée par PCR (Polymerase Chain Reaction) au moyen de la Taq polymérase à partir du plasmide pSV-E tel que défini précédemment en utilisant comme amorces respectivement les oligodésoxynucléotides E-5' et E-3' de séquences :

E-5' : 5'GTTCGACCTGTACGGATCCGTTACTTCTGCTCTA₃'

E-3' : 5'TCAATGATCACGCTAGTCCCGGGCAAGCTTCT

CTCT₃' ,

la ligne en pointillés représentant respectivement les sites Bam HI et Sma I;

b) digestion de l'ADN obtenu à l'étape précédente par Bam HI et Sma I;

c) ligation des fragments d'ADN obtenus dans le plasmide pVL 941-poly obtenu à partir de pVL941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI, et digéré par Bam HI et Sma I pour obtenir un plasmide intermédiaire ;

d) substitution du fragment compris entre le site Hind III (nucléotide -13 dans la région 5' non codante du virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae et le site PstI (nucléotide 1964 du virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae) du plasmide intermédiaire obtenu à l'étape précédente par

le fragment homologue provenant du plasmide pSV-E.

Un autre plasmide recombinant préféré dénommé pAC-EANS1 comprenant l'ADNc codant pour la protéine E suivie de la protéine NS1 sous forme d'une polyprotéine non clivée est obtenu par mutagénèse dirigée, notamment par PCR, de la séquence VXA (amino-

acide 776 à 778), X représentant les aminoacides G, H ou Q, notamment G chez le VFJ, située en amont du premier aminoacide de NS1, en FYV.

Le site VXA est un site canonique de clivage reconnu par les signalases cellulaires en amont de l'extrémité N terminale de la protéine NS1 des flavivirus. Le tripeptide FYV introduit chez les flavivirus à la place de VXA n'est plus reconnu comme site de clivage.

De préférence, le plasmide dénommé pAC-EANS1 est obtenu par les étapes suivantes :

a) création d'un site Sna BI unique en position 2450, (correspondant à la position entre les aminoacides 777 et 778), de l'ADNc par mutagénèse dirigée par PCR au moyen de la Taq-Polymérase à partir du plasmide pAC-E.NS1 tel, que défini précédemment, en utilisant comme amorces l'oligodésoxynucléotide SP-NS1 de séquence :

5'TCC GCA CTT GAG CTC TCT CTT GCC AAA GTT
GAT GGC GCA TCC TTG ATC TAC GTA AAA TCC TAG AGA CAA

AAA CAT CAT GAT CAC TCC TA₃' ,

la ligne pointillée représentant les codons substitués codant pour FYV, et l'oligodésoxynucléotide E-5' tel que défini précédemment;

b) digestion de l'ADN obtenu par Bam HI et SacI ; (les sites étant situés aux extrémités 5' et 3' respectivement)

c) ligation dans le plasmide pVL 941-poly

obtenu à partir de pVL 941 par insertion d'un multi-linker à l'extrémité 3' du site Bam HI, et digéré par Bam HI et Sac I, de manière à obtenir un plasmide intermédiaire;

5

d) ligation des fragments d'ADN suivants :

- [Bam HI-Eco RI] du plasmide pAc-E2, tel que défini précédemment, correspondant à la protéine E tronquée;
- [Eco RI - Sac I] du plasmide intermédiaire défini précédemment, correspondant aux aminoacides 720 à 790 du Virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae, comprenant la mutagénèse dirigée FYV ;
- [Sac I-Sma I] du plasmide pAc-E.NS1 tel que défini précédemment correspondant à la protéine NS1, dans le plasmide pVL 941-poly obtenu comme décrit précédemment et digéré par Bam HI et Sma I.

15

Les baculovirus recombinants sont obtenus par transfection et recombinaison homologue des plasmides avec le génome du baculovirus de type sauvage, de préférence Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV).

20

Le baculovirus recombinant Ac-E2 obtenu par transfection et recombinaison du génome de AcNPV avec le plasmide p Ac E2 a été déposé à la CNCM le 21 mai 1991 sous le n° I-1098.

25

Le baculovirus Ac-E Δ NS1 obtenu par transfection et recombinaison du génome de Ac NPV avec le plasmide de pAc-E Δ NS1 a été déposé à la CNCM le 21 mai 1991 sous le n° I-1097.

30

Les baculovirus expriment les protéines E tronquée ou entière associée/en tandem avec NS1 après maturation (glycosylation, oligomérisation....) à des taux élevés lorsqu'ils sont propagés dans des cellules eucaryotes d'insecte, en particulier des cellules de Spodoptera frugiperda.

Les protéines ainsi obtenues sont antigéni-

ques et trouvent par conséquent leur application dans des procédés de diagnostic in vitro des infections virales causées par les Flaviviridae ou virus apparentés aux Flaviviridae.

5 La présente invention a ainsi également pour objet un procédé de diagnostic in vitro chez l'homme ou chez l'animal, par mise en évidence des anticorps dirigés contre tout ou partie de la protéine E et/ou la protéine NS1 immunogène telle qu'obtenue par un
10 baculovirus recombinant suivant l'invention, dans un prélèvement biologique de l'homme ou de l'animal, dans lequel on met en contact la ou les protéines immunogènes E et NS1 avec le prélèvement biologique de l'homme ou de l'animal pouvant contenir lesdits anticorps et
15 on révèle la présence des anticorps fixés.

Ce procédé peut être basé sur une méthode radioimmunologique de type RIA, RIPA ou IRMA ou une méthode immunoenzymatique de type WESTERN-BLOT sur bandelettes ou de type ELISA.

20 La présente invention a également pour objet une trousse de diagnostic in vitro des infections causées par les Flaviviridae ou les virus apparentés aux Flaviviridae pour la mise en oeuvre du procédé ci-dessus mentionné, comprenant tout ou partie de la protéi-
25 ne NS1 et/ou la protéine E immunogènes telles qu'obtenues par un baculovirus recombinant suivant l'invention et contenant, en outre, un anticorps spécifique d'un isotype d'immunoglobuline.

30 La présente invention a également pour objet un vaccin destiné au traitement et à la prévention des infections causées par les Flaviviridae ou les virus apparentés aux Flaviviridae chez l'homme ou chez l'animal, dans lequel l'agent vaccinant consiste en tout ou partie de la protéine E et/ou de la protéine NS1, obtenues par un baculovirus recombinant selon

l'invention.

L'agent vaccinant peut être administré sous la forme de protéine(s) purifiée(s) en utilisant les propriétés de fractionnement du Triton X 114, ou encore par l'intermédiaire d'un baculovirus recombinant tel que décrit précédemment produisant la ou les peptides immunogènes ou encore par l'intermédiaire de cellules d'eucaryotes, telles que les cellules d'insectes, notamment les cellules de Spodoptera frugiperda servant à la propagation du baculovirus recombinant et des protéines immunogènes produites par lui.

La préparation massive de ces protéines recombinantes peut être obtenue soit en fermenteur de cellules Spodoptera frugiperda, soit à partir de larves d'insectes infectées par le baculovirus recombinant.

Outre la séquence peptidique immunogène, le vaccin peut contenir un adjuvant doué de propriétés immunostimulantes.

Parmi les adjuvants que l'on peut utiliser figurent les sels minéraux tels que l'hydroxyde d'aluminium, des composés hydrophobes ou des surfactants tels que l'adjuvant incomplet de Freund, le squalane ou des liposomes, des polynucléotides synthétiques, des microorganismes ou composants de microorganismes tels que le murabutide, des molécules artificielles synthétiques telles que l'imuthiol ou le levamisole, ou encore des cytokines telles que les interférons α, β, γ ou les interleukines.

L'invention a, en outre, pour objet un anticorps monoclonal dirigé contre tout ou partie d'une protéine E et/ou Sl, obtenue par un baculovirus recombinant tel que décrit précédemment.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention

peuvent être préparés selon une technique classique. A cet effet, les polypeptides peuvent être couplés si nécessaire à un agent immunogène, tel que l'anatoxine tétanique, par un agent de couplage tel que le glutaraldéhyde, un carbodiimide ou la benzidine bis diazotée.

On décrira ci-après plus en détail dans le cas du virus de la fièvre jaune (VFJ) :

- l'obtention des baculovirus recombinants selon l'invention exprimant tout ou partie des protéines E et/ou NS1 du VFJ,

- les propriétés physicochimiques, antigéniques et immunogènes des protéines E et NS1 du VFJ produites par des baculovirus recombinants en se référant aux figures annexées sur lesquelles :

- la Figure 1 représente un schéma de construction du plasmide pAc-E.NS1 permettant d'obtenir le baculovirus recombinant Ac-E.NS1.

La séquence codant pour les protéines E et NS1 du VFJ incluant le codon d'initiation prélevé du gène VP1 du virus SV 40, le peptide signal de la protéine E et le codon de terminaison à l'extrémité C terminale de la protéine NS1 sont isolés du plasmide pSV-E.NS1-(TAG). Les séquences représentant le génome du virus AcNPV et l'ADNc du VFJ sont indiquées par les lignes épaisses et les parties hachurées, respectivement.

- la Figure 2 représente l'organisation des séquences du gène de la polyédrine du plasmide pVL 941-poly servant du vecteur de transfert pour sa recombinaison homologue avec le baculovirus, et du plasmide recombinant pAc-E.NS1.

La séquence nucléotidique à la jonction entre le gène de la polyédrine et l'extrémité 5' de la région codant pour les protéines E et NS1 est reportée

sur la figure. Le codon d'initiation ATG et le codon de terminaison TAG sont surmontés d'un trait. La séquence d'acides aminés des extrémités N et C du polypeptide traduit est indiquée sur la figure. La numérotation correspond à celle de la polyprotéine précurseur du VFJ.

- la Figure 3 représente le schéma de construction du plasmide pAc-E1 permettant d'obtenir le baculovirus recombinant Ac-E1,

- la Figure 4 représente le schéma de construction du plasmide pAc-NS1 permettant d'obtenir le baculovirus recombinant Ac-NS1,

- la Figure 5 représente l'organisation des séquences du baculovirus pVL 941-poly servant de vecteur de transfert, et des plasmides recombinants pAc-E1 et pAc-NS1,

La séquence nucléotidique à la jonction entre le gène de la polyédrine et l'extrémité 5' de la région codant pour les protéines E et NS1 est reportée sur la figure. Le codon d'initiation ATG et les codons de terminaison TGA et TAG respectifs des ADNc codant pour E et NS1 sont surmontés à l'aide d'un trait. La séquence d'acides aminés des extrémités N et C du polypeptide traduit est indiquée sur la figure.

- la Figure 6 représente le schéma d'obtention du plasmide p Ac-E2 à partir de l'ADN du VFJ.

- la Figure 7 représente le schéma d'obtention du plasmide p Ac-EANS1 par mutation dirigée par PCR sur la séquence en amont de NS1 à partir de la séquence correspondante de p Ac-E.NS1.

- la Figure 8 représente les résultats d'immunisations réalisées chez les souris Swiss avec un lysat de cellules de Spodoptera frugiperda (souche Sf9), infectées par le baculovirus sauvage AcNPV, le virus 17D ou un lysat de cellules Vero infectées par

le virus 17D,

- la Figure 9 représente les résultats d'immunisations réalisées chez des souris Swiss avec un lysat cellulaire de Sf9 infectées par le baculovirus AcNPV et les baculovirus recombinants de l'in-

5

vention Ac-E.NS1, Ac-E1 et Ac-NS1;
- la Figure 10 représente les résultats d'immunoprécipitation d'un lysat obtenu en tampon RIPA de cellules Vero infectées par le VFJ et marquées à la

10

méthionine [³⁵S] en présence d'actinomycine D. Le lysat radiomarké (10⁶ cpm dans un volume de 200 µl) est immunoprécipité avec 20 µl de sérum de souris prélevé avant l'épreuve par le virus 17D en présence de

15

protéine A Sépharose (Pharmacia).
17D i.p. : sérums de souris immunisées avec le VFJ en intrapéritonéale;

17D Lys : sérums de souris immunisées avec le lysat des cellules Vero infectées par le VFJ;

AcNPV : sérums des souris immunisées avec le lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus sauvage;

20

Ac-E.NS1 : sérums des souris immunisées avec le lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1;

25

Ac-E1 : sérums des souris immunisées avec le lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant Ac-E1;

Ac-NS1(A) : sérums des souris immunisées avec le lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant Ac-NS1 étant décédées après l'épreuve avec le virus infectieux;

30

Ac-NS1(B) : sérums des souris immunisées avec le lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant Ac-NS1 ayant survé-

cues après l'épreuve avec le virus infectieux.

La position des protéines E et NS1 est indiquée par les flèches.

5

I - Construction des baculovirus recombinants

La construction des plasmides recombinants est effectuée en utilisant les techniques standards décrites par Maniatis et coll, (3).

10

1. Construction du baculovirus recombinant Ac-E.NS1

La séquence codant pour les protéines E et NS1 du VFJ comportant le peptide signal de E et le codon d'initiation ATG de la protéine VP1 de SV40 est isolée du plasmide pSV-E.NS1 sous forme d'un fragment d'ADN de 2,6 kpb, comme décrit par Desprès et coll, (4). Avant son insertion dans le baculovirus vecteur, un codon de terminaison en phase est inséré à l'extrémité 3' de cet ADN complémentaire par digestion du plasmide pSV-E.NS1 avec XbaI (site unique dans le multilinker) et remplissage avec le fragment de Klenow de manière à générer la séquence peptidique exogène GGSSS à l'extrémité carboxylique de la protéine NS1 (Figure 2). Les extrémités franches sont circularisées avec l'ADN ligase de T4, générant ainsi le plasmide pSV-E.NS1-(TAG) (Figure 1).

15

20

25

30

Pour faciliter son insertion dans le vecteur navette, l'ADN passager est isolé de pSV-E.NS1-(TAG) sous forme de deux fragments de 0,70 kpb et 1,90 kpb comme cela apparaît sur la Figure 1.

Le fragment de 0,70 kpb contenant la séquence codant pour la moitié N-terminale de la protéine E y compris son peptide signal, est clivée par Hind III (nucléotide 1488 sur le génome de SV40), rempli avec

le fragment de Klenow et digéré par Apa I (nucléotide 1603 sur le génome du VFJ).

Le fragment de 1,90 kpb contenant la séquence codant pour la moitié C terminale de la protéine E suivie par la protéine NS1 complète, est digéré par Bgl II (site 3' terminal du multilinker de l'ADN recombinant de SV40), rempli avec le fragment de Klenow et digéré par Apa I.

Le plasmide pVL 941-poly est obtenu à partir du plasmide pVL 941 décrit par Luckow et Summers (5) par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI (Figure 2). Le plasmide pVL941-poly est digéré par Bam HI, rempli par le fragment de Klenow, déphosphorylé et utilisé pour l'insertion des fragments d'ADNc du VFJ de 0,70 et 1,90 kpb. La substitution par les gènes de E et NS1 dans le gène de la polyédrine commence au nucléotide + 35, en numérotant le A du codon d'initiation modifié ATT de la polyédrine par + 1. Le plasmide recombinant contenant le segment d'insertion de 2,6 kpb dans l'orientation correcte est désigné pAc-E.NS1. Dans le plasmide recombinant, les extrémités franches du site Bam HI sont ligaturées à celles du site Hind III générant la séquence 5'...GGATCAGCTTATGAAGATGG...3' dans la région non-codante, comme cela apparaît sur la Figure 2.

Ce vecteur de transfert est utilisé pour générer le baculovirus recombinant Ac-E.NS1 après transfection et recombinaison homologue avec le génome du virus Autographa California Nuclear Polyhedrosis (Ac NPV) de type sauvage en employant les techniques classiques de précipitation au calcium-phosphate décrites par Summers et Smith (6).

Des particules virales occlusion-négatives sont purifiées en plages et propagées dans des cellules de Spodoptera frugiperda Sf9 (isolat clonal 9 de

la souche IPLB-Sf21-AE).

Pour confirmer que la totalité de l'ADNc du VFJ a été transféré dans le génome du baculovirus, on extrait l'ADN viral à partir de cellules infectées par Ac-E.NS1. Dans le but d'isoler la séquence codant pour E et NS1, on a tiré parti de la présence de deux sites Eco RV aux deux extrémités de l'ADNc du VFJ, l'un en position-96 sur le gène de la polyédrine, l'autre dans le multilinker en aval du segment d'insertion.

Après séparation des produits de digestion sur gel d'agarose, l'ADN inséré ayant des dimensions correctes est révélé par utilisation d'une sonde d'ARNc spécifique obtenue à partir du plasmide pGX4-E1 (Ruiz Linarès et coll, (7)).

2. Construction du baculovirus recombinant

Ac-E1

Le baculovirus recombinant Ac-E1 contient l'ADNc isolé du plasmide pSV-E (Desprès et coll, (4)). Cet ADNc code pour le peptide signal de la protéine E (aa 271 à 285 de la polyprotéine précurseur du virus 17D) suivi de la protéine E délétée de son extrémité C terminale (aa 286 à 720). Le plasmide pAc-E1 est généré après ligation des fragments [Xho I-Apa I] du plasmide pAc-E.NS1 (décrit précédemment), et [Apa I-Bgl II] du plasmide pSV-E (DESPRES et coll. (4)) avec le vecteur de transfert pVL 941-poly digéré par Xho et BamH I (Figure 3). Le cadre de lecture ouvert de l'ADN passager inséré dans le gène de la polyédrine est décrit dans la Figure 5.

3. Construction du baculovirus recombinant

Ac-NS1

Le baculovirus recombinant Ac-NS1 contient l'ADNc du virus 17D codant pour la glycoprotéine NS1

isolée du plasmide pSV-E.NS1-(TAG) décrit précédemment. Cet ADNc code pour le peptide signal potentiel de la protéine NS1 (aa 758 à 778) suivi de la protéine NS1 (aa 779 à 1129). Le plasmide pAc-NS1 a été généré
 5 après ligation des fragments [Tth 111 I-Mlu I] (nt 2389 à 2947 du génome viral) et [Mlu I-Pst 1] (nt 2947 à 3506; Pst 1 est un site du multilinker) avec le vecteur transfert pVL941-poly digéré par BamH 1 et Pst 1 (Figure 4). Le cadre de lecture ouvert de l'ADN passager inséré dans le gène de la polyèdrine est décrit
 10 dans la Figure 5.

4. Construction du baculovirus recombinant

Ac-E2

Le baculovirus recombinant Ac-E2 contient
 15 l'ADNc codant pour la protéine E délétée de son domaine d'ancrage transmembranaire. Le plasmide pAc-E2 est généré à partir du plasmide pSV-E (Després et coll. (4)). Les sites uniques Bam HI et Sma I ont été créés par mutagénèse dirigée aux extrémités des
 20 régions non codantes (RNC) en 5' et 3' respectivement du gène à partir du plasmide pSV-E. Deux oligodésoxynucléotides synthétiques ont été préparés pour réaliser la mutagénèse dirigée :

a) un oligodésoxynucléotide de 33 bases E-5'
 25 de séquence :

E-5' : $_5\text{'GTCGACCTGTACGGATCCGTTACTTCTGCTCTA}_3\text{'}$,

correspondant à la séquence en 3' de la RNC en 5' du gène E inséré dans le plasmide pSV-E (Després et Coll.(4)). Cette séquence correspond aux nucléotides
 30 -46 à -14, en comptant le A de l'ATG initiateur de la traduction comme + 1. Un site Bam HI (souligné en pointillé sur la séquence E-5') est généré par l'oligomère de 33 bases E-5' en position - 29 à -34 à partir de l'ATG ;

b) un oligodésoxynucléotide de 36 bases E-3' de séquence :

E-3':₅'TCAATGATCACGCTAGTCCCGGGCAAGCTTC

5

TCTCT₃'.

Cette séquence est complémentaire aux nucléotides 7 à 42, en comptant le nucléotide en 3' du codant stop TGA de la RNC en 3' du gène codant pour la protéine E comme + 1, dans le plasmide pSV-E (Després et coll. (4)). Un site Sma I (souligné en pointillé sur la séquence E-3') est généré par l'oligomère de 36 bases E-3' en position 20 à 25 à partir du TGA.

Les oligomères E-5' et E-3' sont utilisés comme amorces pour la synthèse d'un produit PCR de 1400 pb par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pSV-E, correspondant à la protéine E du virus.

A cet effet 10 ng du plasmide pSV-E sont mélangés avec 10 ng des oligomères E-5' et E-3' en présence de la Taq-polymérase. 25 cycles de dénaturation à 94°C sont réalisés pendant 1 min 30 sec. Les oligomères sont fixés à 55°C pendant 2 minutes et une extension est réalisée à 72°C pendant 2 minutes. A la fin des réactions d'amplification, le produit PCR est déposé sur un gel d'agarose. Le produit PCR de 1400 pb est électro-élué du gel d'agarose, traité au phénol/chloroforme puis précipité à l'éthanol à 95% à - 20°C en présence d'acétate de sodium 0,2 M. Après précipitation par centrifugation, l'ADN séché est repris dans les tampons commerciaux pour une digestion par les enzymes de restriction Bam HI et Sma I. A la fin de la digestion le produit PCR digéré est traité comme pour les plasmides précédemment décrits pour obtenir un plasmide intermédiaire.

Le plasmide PVL 941-poly décrit précédemment

est digéré par Bam HI et Sma I et mis en ligation avec le produit PCR digéré correspondant au gène codant pour la protéine E tronquée du VFJ. Pour éviter le maintien de mutations apportées par la PCR au niveau du gène codant pour la protéine E, le fragment compris entre le site Hind III (nucléotide-13) et le site Pst I (nucléotide 1964 du génome du VFJ), soit environ 1050 pb du plasmide intermédiaire, est substitué par le fragment homologue provenant du plasmide pSV-E. Le plasmide pAc-E2 est obtenu (fig. 6). Le reste de la séquence a été contrôlée par séquençage direct.

Le nouveau plasmide pAc-E2 à l'origine du baculovirus recombinant Ac-E2 contient le même cadre de lecture ouvert codant pour la protéine E tronquée que celui présent dans le plasmide pAc-E1; seules les RNC aux extrémités du cadre de lecture ouvert ont été modifiées.

5. Construction du baculovirus recombinant

Ac-EANS1

Le baculovirus recombinant Ac-EANS1 contient l'ADNc codant pour la protéine E suivie de la protéine NS1 sous la forme d'une polyprotéine non clivée. Le site de clivage entre les deux antigènes majeurs du VFJ a été modifié par mutagenèse dirigée, de telle façon qu'il ne soit plus reconnu par les signalases cellulaires, générant ainsi une polyprotéine de 100 kDa correspondant aux protéines E et NS1 liées de façon covalente.

Le site de clivage (aa 776 à 778) VGA en amont du premier acide aminé de NS1 (aa 779) reconnu par les signalases cellulaires permet le clivage de E et NS1; ce tripeptide a été modifié en FYV par mutagenèse dirigée de façon à ce qu'il ne soit plus reconnu comme site cryptique de clivage selon les règles de Von Heijne (23).

A cet effet on a synthétisé un oligodésox-

nucléotide de 89 bases SP-NS1 de séquence :

5' TCC GCA CTT GAG CTC TCT CTT GCC AAA GTT GAT GGC GCA
TCC TTG ATC TAC GTA AAA TCC TAG AGA CAA AAA CAT CAT

5 GAT CAC TCC TA₃,

complémentaire des nucléotides 2413 à 2501 du génome du VFJ, souche vaccinale 17D-204 ; la substitution des codons correspondants à VAG en codons correspondant à FYV est soulignée sur la séquence de l'oligomère SP-NS1. Un site Sna BI unique est généré en position 2450 (entre les acides aminés 777 et 778) par l'oligomère SP-NS1.

15 L'oligomère SP-NS1 et l'oligomère E-5' décrit précédemment sont utilisés comme amorces pour la synthèse d'un produit PCR de 1500 pb à partir du plasmide pSV-E.NS1 décrit précédemment, correspondant à la protéine E complète plus 15 aminoacides N-terminaux de la protéine NS1.

20 A cet effet 10 ng du plasmide pAc-E.NS1 sont mélangés avec 10 ng des oligomères E-5' et SP-NS1 en présence de la Taq-Polymérase. On réalise une amplification sur 25 cycles comme décrit précédemment pour pAc-E2. Le produit PCR de 1500 pb est purifié comme décrit pour pAc-E2 et digéré par Bam HI (site unique apporté par E-5') et par Sac I, (site en 2490 du génome du VFJ apporté par SP-NS1).

30 Le vecteur de transfert pVL 941-poly décrit précédemment est digéré par Bam HI et Sac I. Les fragments obtenus sont mis en ligation avec le produit PCR digéré correspondant à la protéine E complète plus 13 aminoacides de NS1 du VFJ. Le plasmide résultant pAc-EΔNS1 (α) est un plasmide intermédiaire pour la construction du plasmide pAc-EΔNS1; ce plasmide intermédiaire contient la substitution VGA en FYV (aminoacide 776 à 778) à l'extrémité carboxylique de

la protéine E du VFJ.

La construction finale pour obtenir le plasmide pAc-E NS1 a été réalisée par ligation des fragments :

- 5 - [Bam HI-EcoRI] du plasmide pAc-E2 correspondant à la protéine E tronquée,
- [EcoRI-SacI] du plasmide pAc-EWNS1(a) correspondant aux aminoacides 720 à 790 du VFJ incluant la mutagenèse dirigée FYV,
- 10 - [SacI-SmaI] du plasmide pAc-E.NS1 correspondant à la protéine NS1,

les trois fragments étant introduits dans le vecteur pVL941-poly digéré par Bam HI et Sma I.

- 15 La ligation des quatre fragments d'ADN génère le plasmide pAc-EANS1 (fig. 7).

La complexité de ces constructions a été rendue nécessaire par le risque d'introduction de mutations aléatoires lors de la PCR réalisée pour obtenir la mutagenèse dirigée. Le plasmide pAc-EWNS1 ainsi obtenu code pour les protéines E et NS1 en tandem non clivées du VFJ. Le baculovirus Ac-EWNS1
20 généré par transfection ne diffère du virus Ac-E.NS1 que par la substitution VGA en FYV à l'extrémité carboxylique de la protéine E.

- 25 II - Expression des baculovirus recombinants
A/ Expression du baculovirus recombinant Ac-E.NS1

- 1. Détection des protéines E et NS1 recombinantes

30 Les cellules Vero infectées par le VFJ ou les cellules SF9 infectées par les différents baculovirus l'ont été à raison approximativement de 10 unités formant plaque (UFP) par cellule.

a) Marquage des protéines dans des cellules Sf9 et Vero.

Avant le marquage, les cellules sont lavées à deux reprises et incubées dans un milieu exempt de méthionine pendant 60 minutes. Les cellules Sf9 sont radiomarquées pendant 180 minutes à 27 heures après l'infection (h p.i) avec 100 μ Ci de [35 S] méthionine par ml. Les cellules Vero (lignées cellulaires de reins de singe vert d'Afrique) infectées par le VFJ sont prétraitées à 8 h p.i avec 5 μ g/ml d'actinomycine D (act D) et marquées à 25 h p.i pendant 3 heures avec 100 μ Ci de [35 S] méthionine par ml en présence d'actinomycine D. Lorsqu'elles sont marquées en présence de tunicamycine (5 μ g/ml), les cellules sont prétraitées pendant 60 min. avec cette drogue.

Pour les essais de marquage avec chasse ("pulse-chase"), on marque des cellules infectées pendant 30 minutes avec 200 μ Ci/ml de [35 S] méthionine par ml. Après la période de marquage, les cellules sont lavées et incubées avec un excès de méthionine froide pendant des durées variables.

Après marquage ou chasse, les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées par addition de 9 volumes d'éthanol à 95% et incubation à - 20°C pendant 18 heures comme décrit par Desprès et coll, (4). Pour analyser les protéines intracellulaires, les cellules sont lavées à deux reprises avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) froide et lysées avec un tampon RIPA froid (50 mM tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,1 % SDS; 1% Triton X 100; 1% deoxycholate) contenant 25 μ g/ml d'aprotinine (Sigma). Après 5 mn d'incubation à 0°C, les extraits cellulaires sont clarifiés par centrifugation pendant 5 min. dans une minicentrifugeuse. Les protéines sont immunoprécipitées en utilisant le protocole décrit par Ruiz-Linarès et coll, (7) et résolues sur des gels SDS-polyacrylamide à 12%.

b) Analyse Western-blot

Les protéines séparées sur gel de SDS-polyacrylamide sont transférées par électrophorèse sur des filtres de nitrocellulose (Schleicher et Schuell, RFA). La membrane est saturée avec le tampon de lavage (20 mM Tris HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) contenant 3% de sérum foetal de bovin et mise à incuber pendant 1 nuit à 4°C avec un immunsérum de lapin dilué au 1/50 dirigé contre la protéine NS1 (Schlesinger et coll, (1)) ou une protéine de fusion TrpE-E obtenue par insertion de l'ADNc codant pour la protéine E dans la région 3' du gène TrpE de l'opéron tryptophane dans le plasmide PATH décrit par C. Dieckmann et A. Tzagoloff (J. Biol. Chem. 1985, 260, p. 1513-20). Après plusieurs lavages, la membrane est mise à incuber successivement à température ambiante avec un sérum de cheval anti-Ig de lapin biotinylé dilué au 1/500 et avec un complexe dilué au 1/500 de Streptavidine-péroxydase de raifort biotinylée (Amersham). Après lavage, les anticorps liés sont visualisés en mettant à réagir la membrane avec du 4-chloro-1-naphtol à 0,06% (Sigma) et du peroxyde d'hydrogène à 0,015%.

c) Traitement par les Endo- β -N-acétyl-D-glucosaminidases H (Endo-H) et F (Endo-F)

Des cellules Sf9 infectées avec le baculovirus recombinant ou des cellules Vero infectées avec le VFJ sont marquées comme décrit ci-dessus et des extraits cellulaires immuno-précipités à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines du VFJ. Les complexes immuns sont traités avec l'Endo-H (20 mU/ml) ou Endo-F (1U/ml) (Boehringer) en utilisant la technique décrite par Jarvis et Summers (22).

d) Extraction par le Triton X 114

Les cellules sont rincées avec du PBS, mises en suspension dans une solution de Triton X 114 à 2% (BDH) dans 50 mM de tris-HCl pH 7, 5 contenant 25 µg/ml d'aprotinine et incubées pendant 10 min à 0°C. Les phases aqueuse et détergent sont obtenues par incubation dans un bain marie à 37°C puis par centrifugation à 37°C dans une minicentrifugeuse à 3000 t/min. La phase aqueuse est récupérée et après plusieurs lavages avec du tampon E (10 mM de tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA), la phase détergent est obtenue. Les phases aqueuse et détergent diluées avec 5 volumes de tampon E sont précipitées pendant une nuit à l'aide de 9 volumes d'éthanol à 95% à - 20°C. Les protéines sont analysées sur des gels de polyacrylamide.

e) Essais d'immunofluorescence

Des cellules de S.frugiperda cultivées sur des lamelles sont infectées avec AcNPV ou le virus recombinant pendant 24 heures à 27°C. Les cellules sont fixées avec du formaldéhyde et, si nécessaire, perméabilisées avec du Triton X 100 à 0,1% dans du PBS comme décrit précédemment (Desprès et coll, (8)). Les cellules fixées perméabilisées ou non sont mises à incubé pendant 20 min. à température ambiante avec un immunosérum de souris anti VFJ (dilution 1 : 40) ou avec une dilution au 1 : 20, de soit l'anticorps monoclonal (AcMc) 864 spécifique de E (Gould et coll. (9)), soit l'anticorps monoclonal 8G4 spécifique de NS1 (Schlesinger et coll.(10)). Une immunoglobuline anti-souris conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Silenius) est utilisée comme second anticorps.

2/ Expression des protéines E et NS1 recombinantes du baculovirus Ac-E.NS1

Le plasmide recombinant Ac-E.NS1 contient l'ADNc du VFJ qui code pour une polyprotéine précurseur des protéines E et NS1, ayant un poids moléculaire théorique de 100 kDa (865 résidus d'acides aminés). Pour confirmer que ces protéines sont exprimées et subissent des maturations correctes dans les cellules Sf9, on marque des cellules infectées avec Ac-E.NS1 à l'aide de [³⁵S] méthionine pendant 3 heures à 27 h p.i. Cette durée s'est avérée être optimale pour le marquage des protéines recombinantes.

Lorsque les protéines virales sont immunoprécipitées avec un immunsérum de souris dirigé contre le VFJ ou avec des anticorps monoclonaux spécifiques de E et de NS1, les protéines recombinantes E et NS1 migrent avec les mêmes mobilités que les protéines authentiques obtenues à partir de cellules Vero infectées avec le VFJ. Lorsque les cellules sont traitées avec la tunicamycine, un inhibiteur de N-glycosylation des protéines, la protéine NS1 authentique et la protéine NS1 recombinante co-migrent avec un poids moléculaire apparent de 43 kDa. Ni la protéine recombinante, ni la protéine E authentique ne sont glycosylées comme il a pu en être jugé d'après l'absence d'effets de la drogue sur leur mobilité électrophorétique.

L'antigénicité des protéines recombinantes est analysée en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines E et NS1. Les anticorps monoclonaux neutralisant 2C9 (Schlesinger et coll, (10)) et 864 (ci-dessus mentionné) reconnaissent la protéine d'enveloppe synthétisée par la souche vaccinale 17D-204 du VFJ et réagissent avec la protéine E recombinante exprimée par le virus hybride SV40-VFJ (Desprès et coll, (4)). Les deux types d'anticorps monoclonaux réagissent également avec la protéine E

recombinante synthétisée dans les cellules d'insectes. Comme ces anticorps monoclonaux reconnaissent la forme native mais non la forme dénaturée de la protéine E (Desprès et coll, (4)), on peut en conclure que le
5 repliement de la protéine recombinante est similaire à celui de la protéine authentique. Les deux types d'anticorps monoclonaux immunoprécipitent des polypeptides supplémentaires qui migrent plus vite que la protéine E et pourraient être similaires aux produits
10 de dégradation déjà trouvés dans les cellules infectées avec le VFJ, comme décrit par Schlesinger et coll, (11) et Cane et Gould (12).

L'anticorps monoclonal 8G4 immunoprécipite la protéine NS1 du VFJ produite dans les cellules Vero
15 infectées aussi bien que la forme non glycosylée synthétisée en présence de tunicamycine. La reconnaissance par l'anticorps monoclonal 8G4 est considérablement affectée lorsque, la protéine est traitée par du SDS et du dithiotréitol, ce qui indique que l'épi-
20 tope est dépendant de la conformation. L'anticorps monoclonal 8G4 réagit également avec la protéine NS1 recombinante obtenue à partir de cellules Sf9 infectées par Ac-E.NS1. En plus de la protéine recombinante de 48 kDa, un polypeptide mineur avec un poids
25 moléculaire apparent de 47 kDa est immuno-précipité à partir d'un lysat de cellules d'insectes infectées par Ac-E.NS1.

Les analyses détaillées de cellules de Sf9 infectées avec le baculovirus recombinant Ac-E.NS1 ont
30 révélé l'existence de deux grands polypeptides ayant des poids moléculaires apparents d'approximativement 100 kDa, ce qui représente la taille attendue pour le précurseur non clivé. Ces polypeptides réagissent avec un immunosérum de souris dirigé contre les protéines structurales et non structurales du VFJ aussi bien

qu'avec les anticorps monoclonaux spécifiques de E et de NS1. Le plus grand polypeptide (105 kDa) migre avec la même mobilité que la protéine NS5 non structurale du VFJ. Lorsque la synthèse est effectuée en présence
5 de tunicamycine, seule la bande migrant le plus rapidement est détectée ce qui suggère que les polypeptides ayant des mobilités plus rapides et plus lentes représentent les formes non glycosylées et glycosylées respectivement. Ces résultats indiquent que le poly-
10 peptide de 100 kDa est en fait le précurseur non clivé des protéines E et NS1 recombinantes.

Détection des formes oligomériques et associées à la membrane de la protéine NS1

15 L'oligomérisation de NS1 dans les cellules de moustiques et de mammifères infectés par différents flavivirus a été décrite par Winkler et coll, (13, 14), Mason (15) et Schlesinger et coll, (16). La question est posée de savoir si la protéine NS1 forme
20 également des oligomères dans les cellules de lépidoptères infectées avec le virus Ac-E.NS1. Il était ainsi nécessaire d'établir les conditions pour détecter les oligomères de NS1 dans les cellules de mammifères infectés avec le VFJ.

25 Les dimères NS1 formés pendant l'infection par le virus de la Dengue sont résistants à des traitements réducteurs et par le SDS mais sensibles à la dénaturation par la chaleur. Les cellules de primates infectés avec la souche 17D-204 du VFJ sont marquées
30 pendant 30 min à 25 h p.i en présence d'actinomycine D et chassées pendant des durées variables. Les protéines obtenues à partir des lysats cellulaires sont dissoutes dans un tampon de Laemmli et analysées sur gel de polyacrylamide avant et après dénaturation par la chaleur. Dans les échantillons dénaturés, la protéine

NS1 de 48 kDa est détectée sous la forme d'une bande faible après une période de marquage de 30 min., et devient de plus en plus importante après une incubation de 60 min. Lorsque les échantillons ne sont pas dénaturés par la chaleur, la protéine de 48 kDa est détectée à la fin du marquage sans qu'elle s'accumule pendant la chasse. De manière concomittante, une nouvelle bande virale avec un poids moléculaire apparent de 72 kDa apparaît, qui devient de plus en plus intense durant la chasse.

Le polypeptide de 72 kDa est élué à partir du gel et on montre qu'il représente une forme oligomérique de la protéine NS1. Le polypeptide isolé est analysé par Western-blot en utilisant un immunosérum de lapin dirigé contre la protéine NS1 du VFJ (Schlesinger et coll, (1)). Le polypeptide de 72 kDa réagit avec le sérum spécifique et après dénaturation par la chaleur se dissocie pour former la protéine NS1 de 48 kDa.

Après traitement des extraits cellulaires avec du Triton X 114, les protéines transmembranaires ayant des séquences d'ancrage hydrophobes se répartissent de manière efficace dans la phase détergent, tandis que les protéines plus hydrophiles, cytosoliques et secrétées restent dans la phase aqueuse. La présence de la protéine d'enveloppe du VFJ ou de la protéine recombinante E exprimée par le virus Ac-E.NS1 dans la phase détergent est révélée par analyse directe de l'extrait cytoplasmique marqué et confirmée par analyse de type Western-blot au moyen d'un immunosérum de lapin dirigé contre la protéine E du VFJ. La protéine E est extraite de manière complète et totale dans la phase détergent comme attendu pour une protéine transmembranaire.

La présence d'oligomères NS1 dans la phase

de détergent est révélée clairement. Cependant des analyses de Wertern-blot avec un immunosérum de lapin dirigé contre la protéine NS1 du VFJ montre que l'oligomère NS1 de 72 kDa est extrait à la fois dans la phase aqueuse et dans la phase détergent. Après dénaturation par la chaleur, la forme oligomérique est dissociée et convertie en une protéine de 48 kDa. En l'absence de chauffage, la plupart des produits apparaissent sous forme d'oligomères. Lorsque la N-glycosylation est bloquée avec de la tunicamycine, on observe la présence d'un polypeptide de 62 kDa dans l'échantillon non chauffé. Lorsque l'échantillon est chauffé, ce polypeptide disparaît tandis qu'apparaît le forme non glycosylée de NS1 (poids moléculaire apparent de 43 kDa). Ce résultat suggère que la protéine de 62 kDa est la forme non glycosylée de la protéine de 72 kDa et que l'oligomérisation de NS1 a lieu sans que soient nécessairement présents des groupes oligosaccharidiques fixés sur les sites NXT/S ou ASN X Thr/Ser présents sur la glycoprotéine. Aucune bande distincte autre que celle correspondant à NS1 n'apparaît après le chauffage, ce qui suggère que le polypeptide de 72 kDa est un homo-oligomère. La différence de poids moléculaire différent entre 72 et 62 kDa correspond vraisemblablement au poids moléculaire de 4 oligosaccharides, étant donné que le monomère NS1 possède des résidus glycans sur les deux sites de N-glycosylation qui ensemble contribuent à 5 kDa (Desprès et coll, (4)).

La protéine NS1 exprimée par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1 est détectée par Western-blot avec l'immun sérum dirigé contre la protéine NS1 du VFJ aussi bien sous la forme monomérique gp48 que sous la forme oligomérique gp72. Si la forme monomérique est spécifiquement détectée dans la phase aqueuse, la

forme oligomérique est retrouvée dans les phases aqueuse et détergent de Triton X114. Ces résultats signifient que l'oligomérisation et l'association aux membranes de la protéine recombinante NS1 ont lieu dans les cellules d'insectes infectées par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1 et à une température de 27°C.

Ces expériences confirment que la protéine d'enveloppe E du VFJ ou du virus Ac-E.NS1 possède les propriétés d'une protéine membranaire intégrale et montrent que la glycoprotéine NS1 de 48 kDa du VFJ ou du virus Ac-E.NS1 nouvellement synthétisée peut être convertie en une forme oligomérique thermolabile gp 72 qui peut être retrouvée associée aux membranes.

Le polypeptide de 100 kDa synthétisé par Ac-E.NS1 est complètement extrait dans la phase détergent et réagit avec des immunosérums de lapin dirigés contre les protéines E ou NS1. Le résultat confirme que le polypeptide représente le précurseur non clivé de E et NS1 recombinantes et indique qu'il est fortement associé aux membranes intracellulaires. Des analyses de marquage avec chasse montrent que le clivage destiné à générer les protéines recombinantes E et NS1 a lieu après que le précurseur ait été complètement transféré dans la lumière du RE (réticulum endoplasmique). On a également trouvé que la maturation du précurseur n'était pas modifiée par la tunicamycine, dans la mesure où les protéines E et NS1 non glycosylées étaient produites en présence de cette drogue.

Transport et sécrétion des protéines NS1 authentiques et recombinantes dans des cellules infectées

Comme les protéines NS1 de différents flavivirus ont été décrites comme étant les antigènes

solubles fixant le complément et plus tard comme une protéine sécrétée dans le milieu de culture cellulaire, il était intéressant de déterminer si les protéines NS1 authentique et recombinante synthétisées dans des cellules Vero infectées par le VFJ ou dans des cellules Sf9 infectées par le baculovirus étaient également sécrétées dans le milieu.

Les cellules Vero infectées avec le VFJ sont radiomarquées avec de la [³⁵S] méthionine pendant 30 min. puis chassées avec un excès de méthionine froide pendant 0 à 5 heures. La protéine NS1 authentique est présente dans le surnageant cellulaire après 2 heures de chasse, après quoi un plateau est rapidement atteint. La forme sécrétée de NS1 migre sous forme d'une bande diffuse avec un poids moléculaire apparent légèrement supérieur à sa contrepartie cellulaire. Bien que la proportion de NS1 dans les fractions extra- et intracellulaires n'ait pas été quantifiée, des analyses par autoradiographie indiquent clairement qu'une grande partie reste sous forme intracellulaire. A partir de analyses de marquage avec chasse, on peut conclure que la sécrétion de NS1 est un processus plutôt lent dans la mesure où plus de 5 heures sont nécessaires pour que la moitié des protéines NS1 radiomarquées soit libérée dans le milieu de culture cellulaire. On montre également que la forme extracellulaire correspond à l'oligomère gp 72 et que celui-ci migre sous forme d'une bande plus large que l'oligomère intracellulaire. Il disparaît après chauffage tandis que la forme monomérique de NS1 sécrétée apparaît. Un traitement par la tunicamycine ne fait pas disparaître la sécrétion de NS1 comme cela ressort de la présence de l'oligomère non glycosylé p62 de NS1, dans le milieu de culture.

A l'opposé, des cellules Vero infectées avec

le VFJ, la protéine recombinante NS1 obtenue à partir de cellules Sf9 infectées par Ac-E.NS1 n'est pas secrétée car aucun des polypeptides recombinants n'a pu être détecté dans la fraction extra-cellulaire après un marquage de 30 min. suivi par une chasse de 3 heures. La durée de la chasse n'excédait pas des périodes trop longues en raison d'une éventuelle lyse cellulaire due à l'infection par le baculovirus. Les cellules Sf9 infectées par Ac-E.NS1 non perméabilisées montrent une réaction clairement positive lorsqu'elles sont testées avec l'anticorps 8G4 spécifique de NS1, par immunofluorescence à 24 heures après l'infection, ce qui suggère que, bien que les oligomères de NS1 recombinants ne soient pas secrétés, ils ont pénétré dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi et ont été transportés vers la membrane plasmique avec laquelle ils se sont associés.

N-glycosylation des protéines NS1 authentiques et recombinantes

On sait que l'endoglycosidase H hydrolyse les résidus oligosaccharidiques à haute teneur en mannose liés à l'asparagine de la glycoprotéine, mais non les types complexes de glycans, tandis que l'endo-F clive de la même manière les oligosaccharides à haute teneur en mannose et les oligosaccharides complexes. La résistance à l'élimination des chaînes latérales hydrocarbonées par l'Endo-H est acquise après la conversion de $\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_5$ en $\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-GlcNAc}$, un événement qui a lieu dans la région médiane de l'appareil de Golgi. Ainsi la sensibilité ou la résistance aux traitements par l'endoglycosidase H, des groupes oligosaccharides liés aux asparagines présents sur la protéine NS1 exprimée par le VFJ ou par le virus Ac-E.NS1 devrait donner des indications sur son transport dans le trajet sécrétoire intracellulaire et

une indication quant au compartiment où a lieu l'oligomérisation.

Les échantillons intra- et extracellulaires obtenus à partir des expériences de marquage suivi de 2 heures de chasse sont analysés quant à leur réactivité à l'égard des endoglycosidases. La protéine NS1 extracellulaire du VFJ apparaît être presque complètement résistante à l'Endo-H et montre la même hétérogénéité que la forme non traitée; mais comme on s'y attendait, est sensible à l'Endo-F. Ceci indique que NS1 doit traverser le compartiment sécrétoire où les oligosaccharides à haute teneur en mannose sont modifiés en sucres complexes résistants à l'Endo-H. L'hétérogénéité de la protéine NS1 libérée est probablement due à des modifications multiples des oligosaccharides liés aux résidus Asparagine. Au contraire de la forme sécrétée, la protéine NS1 intracellulaire est totalement sensible à l'Endo-H, ce qui indique qu'elle ne migre pas vers le complexe de Golgi mais reste dans le réticulum endoplasmique. Dans la mesure où la majorité de NS1 est présente sous la forme oligomérique, ces résultats suggèrent fortement que le repliement et l'oligomérisation ont lieu probablement dans le réticulum endoplasmique ou dans un compartiment qui précède le trans-Golgi.

Pour caractériser la nature des N-glycans sur la protéine recombinante NS1, les protéines marquées obtenues à partir de cellules Sf9 infectées par Ac-E.NS1 et traitées avec le Triton X 114 sont réparties entre dans les phases aqueuse et détergent puis la protéine NS1 de chaque phase est immunoprécipitée. Des résultats similaires sont obtenus avec l'une ou l'autre phase. Lorsque la protéine recombinante NS1 composée des deux formes gp 48 et gp 47 est traitée avec l'endoglycosidase H, deux bandes sont observées

qui migrent avec la forme p 43 non glycosylée et la forme gp 47 respectivement. Les deux bandes sont sensibles à l'Endo-F qui réduit leur taille à 43 kDa. Ces résultats suggèrent que gp 48 est la forme sensible à l'Endo-H tandis que gp 47 représente la forme résistante à l'Endo-H. L'existence de la protéine gp 47 résistante à l'Endo-H suggère que, bien que la majorité des protéines NS1 possèdent des glycanes à haute teneur en mannose, certains des oligosaccharides sont raccourcis sans élévation supplémentaire. Ceci signifie que la protéine a été transportée à partir de réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi où des séquences riches en mannoses ont vraisemblablement été modifiées en $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Ce phénomène est observé dans les cellules d'insectes. De plus, de tels glycanes sont connus pour être de pauvres substrats pour l'Endo-H. Ainsi, il apparaît que la glycosylation de la protéine NS1 recombinante exprimée dans les cellules d'insectes est différente de celle de la protéine NS1 authentique synthétisée dans les cellules de mammifères.

B/ Expression des baculovirus recombinants Ac-E 1 et Ac-NS1

L'étude de l'expression des protéines recombinantes E et NS1 en cellules Sf9 a été réalisée 30 h après infection par les baculovirus Ac-E 1 ou Ac-NS1.

1) Expression de la protéine E tronquée

Le baculovirus recombinant Ac-E 1 exprime la protéine d'enveloppe E du virus de la Fièvre Jaune délétée de son domaine d'ancrage transmembranaire C terminal. La protéine recombinante E a un poids moléculaire théorique de 52 kDa (96% de la protéine E du virus 17D).

* Antigénicité de la protéine recombinante E

La protéine E exprimée par le virus Ac-E 1 a un profil de migration électrophorétique très similaire à celles synthétisées par le virus 17D ou par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1. Cette protéine recombinante réagit avec un immunosérum de souris anti-17D ainsi qu'avec les anticorps monoclonaux neutralisants 4E8, 2C9, 2E10, 2D12 et 5E3 (Schlesinger et coll, (10)). L'AcMc neutralisant 864 (Gould et coll, (9)), spécifique des souches vaccinales 17D-204, reconnaît la protéine E recombinante.

* Taux de production en cellules Sf9

La protéine E tronquée dans les cellules d'insecte infectées par le virus Ac-E 1 est visualisée par coloration au bleu de Coomassie à partir des protéines totales d'un lysat de 10^6 cellules après l'analyse sur un gel de polyacrylamide-SDS (PAGE-SDS). On estime la production de E à $10 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules.

* Propriétés physicochimiques de la protéine recombinante E

Si le baculovirus recombinant Ac-E synthétise la protéine E en grande quantité, les essais de purification montrent qu'elle paraît relativement insoluble;

* Sécrétion de la protéine E

La protéine recombinante E n'est pas détectée dans le surnageant des cellules Sf9 infectées par le virus Ac-E.1 L'absence de sécrétion, malgré la délétion de son domaine d'ancrage transmembranaire, se-raît corrélée à sa propriété d'insolubilité dans le compartiment intracellulaire.

* Localisation cellulaire de la protéine E par immunofluorescence

Par immunofluorescence indirecte, la pr-

téine E n'est retrouvée que dans le compartiment intracellulaire, on ne la détecte pas à la surface de la cellule.

5 Le baculovirus recombinant Ac-E1 exprime la protéine E du virus de la Fièvre Jaune, souche vaccinale 17D-204 France, qui présente correctement les épitopes de neutralisation.

10 2) Expression de la protéine NS1

Le baculovirus recombinant Ac-NS1 exprime la glycoprotéine non structurale NS1 (aa 779 à 1129) du virus de la Fièvre Jaune en présence des acides aminés MSMSMILVGVIMMFLSLGVGA (aa 758 à 778) qui composeraient son peptide signal interne.

15 * Antigénicité de la protéine recombinante NS1

La protéine recombinante NS1 synthétisée par le virus Ac-NS1 migre sous forme d'un doublet (PM apparents de 48 et 47 kDa) avec un profil de migration électrophorétique très similaire à celui de la protéine exprimée par le virus 17D ou par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1. Le doublet de NS1 réagit avec un immunosérum de souris anti-17D et avec le AcMc 1A5,4E3,2D10,2G2 et 8G4 (Schlesinger et al, 25 10).

Les AcMc 1A5 et 8G4 ont une activité cytolytique en présence de complément et peuvent protéger passivement la souris et le primate contre le virus 17D injecté en intracérébral.

30 * Glycosylation

En présence de tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation des glycoprotéines ou après traitement avec l'endoglycosidase F, le doublet de NS1 de 48 et 47 kDa disparaît alors qu'apparaît un polypeptide de 43 kDa qui a un profil de migration éle-

trophorétique très comparable à la forme non glycosylée de la protéine NS1 du virus amaril. Ce résultat indique que le doublet 48-47 kDa correspond à deux formes majeures de la protéine recombinante NS1 qui se différencient par la nature de leurs oligosaccharides.

* Taux de production en cellules Sf9

La protéine NS1 dans les cellules d'insecte infectées par le virus Ac-NS1 est visualisée par coloration au bleu de Coomassie à partir d'un lysat de 10^6 cellules après analyse sur un PAGE-SDS. On estime qu'environ 10 µg de protéine NS1 sont produits par 10^6 cellules.

* Oligomérisation et association aux membranes de la protéine NS1

La forme oligomérique de la protéine NS1 (gp 72 kDa), préalablement décrite pour le virus 17D et pour le baculovirus recombinant Ac-E.NS1, est observée dans les cellules d'insecte infectées par le virus Ac-NS1 après coloration au bleu de Coomassie des protéines totales d'un lysat cellulaire non dénaturé analysé sur un PAGE-SDS. L'existence de la forme oligomérique gp 72 kDa de la protéine NS1 exprimée par le virus Ac-NS1 a été confirmée par Western blot avec un immunosérum de lapin anti-NS1. La forme oligomérique de la protéine NS1 est retrouvée associée aux membranes d'après les expériences de fractionnement au détergent non ionique Triton X 114.

* Sécrétion de la protéine NS1

La protéine recombinante NS1 n'est pas détectée dans la surnageant des cellules Sf9 infectées par le virus Ac-NS1. L'absence d'excrétion de la protéine NS1 par les cellules de lépidoptère a été préalablement observée dans les cellules infectées par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1.

* Localisation cellulaire de la protéine NS1

par immunofluorescence

Par immunofluorescence indirecte avec l'AcMc 8G4, la protéine recombinante NS1 est retrouvée à la surface de la cellule Sf9 infectée.

5

C/ Expression du baculovirus recombinant Ac-E2

10

15

20

Le virus Ac-E2 exprime la protéine E tronquée (poids moléculaire apparent 52 kDa). Son taux de production est d'environ 5)g/1.000.000 de cellules Sf9 après 48 heures d'infection. La protéine E est reconnue par les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine d'enveloppe du VFJ : 2C9,2E10,5E3,2D12, 864. La protéine E tronquée exprimée par le virus Ac-E2 est sécrétée par les cellules de Spodoptera frugiperda infectées dans le milieu de culture. Ce phénomène est confirmé par marquage des cellules infectées en présence de méthionine [³⁵S] suivi d'une chasse ainsi que par immunofluorescence indirecte où une fluorescence membranaire est observée. En absence de son domaine d'ancrage transmembranaire, la protéine E exprimée par le virus Ac-E2 est excrétée comme celle synthétisée par le recombinant SV40 SV-E dans les cellules de primate (Desprès et coll., (4)).

25

D/ Expression du baculovirus recombinant Ac-E NS1

30

Le virus Ac-EΔNS1 synthétise une protéine sous la forme d'un doublet ayant un poids moléculaire apparent approximatif de 100 kDa. L'hétérogénéité, qui disparaît en présence de tunicamycine de cette protéine est due à son degré de glycosylation (dans la gp 100, seul le polypeptide représentant NS1 est glycosylé); ce phénomène a déjà été décrit pour la gp 100 exprimé par Ac-E.NS1. La gp100 exprimée par Ac-EΔNS1 est reconnue par les anticorps monoclonaux spécifiques de E (2C9,2E10,2D12, 864) aussi bien que

par les anticorps monoclonaux spécifiques de NS1 (1A5,8G4,2G12). Ce résultat est confirmé par immunofluorescence indirecte. Le taux de production est estimé à 10 µg/1.000.000 de cellules de Spodoptera frugiperda à 2 jours après l'infection. Aucun clivage en E et NS1 n'est observé à partir de la gp100.

L'expression des protéines E et NS1 en tandem n'affecte ni leur conformation ni leur antigénicité respectives.

10 III - Immunité protectrice anti-VFJ induite par les protéines recombinantes E et NS1 chez la souris

L'immunogénicité et le pouvoir protecteur des protéines recombinantes E et NS1 exprimées en cellules d'insecte Sf9 infectées par les différents baculovirus ont été testés chez la souris qui est le modèle animal de référence pour étudier la pathogénèse du VFJ. En effet, si les souches sauvages tuent le rongeur adulte après injection par les voies intracérébrale ou intrapéritonéale, les souches vaccinales 17D sont létales uniquement lorsque le virus est injecté par voie intracérébrale. Les souriceaux sont sensibles au virus sauvage ou vaccinal quelque soit la voie d'inoculation. Ainsi, pour tester le pouvoir immunogène des protéines recombinantes E et/ou NS1, on a inoculé des lysats cellulaires à des souris Swiss de trois semaines. L'épreuve par le virus virulent se fait en injectant le virus par voie intracérébrale.

La détection d'anticorps dirigés contre les protéines E et NS1 dans les sérums de souris immunisées a été réalisée avant que les animaux ne reçoivent une injection intracérébrale du virus infectieux 17D (épreuve ou challenge au VFJ).

a) préparation des lysats cellulaires

Des cellules Sf9 infectées par le baculovirus sauvage (AcNPV) ont été utilisées comme contrôle négatif et deux types de contrôle positif ont été choisis : le virus 17D inoculé par voie intrapéritonéale et les cellules Vero infectées par le virus 17D. Toutes les cellules Sf9 ou Vero ont été prélevées à la 30ème heure après le début de l'infection. Elles ont été mises en suspension dans du PBS et l'extrait cellulaire a été obtenu par une simple étape de congélation-décongélation.

Chaque souris Swiss reçoit une injection intrapéritonéale (i.p.) de 5×10^5 cellules (sauf $2,5 \times 10^6$ cellules infectées par Ac-E.NS1) contenues dans 0,3 ml, sans adjuvant, ou de 10^6 ufp de virus 17D, aux temps J 0 et J 15. Trois semaines après le début de l'inoculation, à J 19, les sérums des souris immunisées sont prélevés et à J 21 les animaux reçoivent une dose de 100 DL50 de virus 17D contenu dans un volume de 30 μ l par voie intracérébrale (i.c.). La mortalité des souris est comptabilisée jusqu'au 21ème jour qui suit l'épreuve soit 6 semaines après le début de l'immunisation.

b) protection des souris immunisées

Les résultats sont présentés dans le tableau

I.

TABLEAU I

5	Virus ou lysat cellulaire injecté	Nombre de souris protégées sur nombre total de souris immunisées (% de protection)	Titre Ac NI* des sérums avant épreuve
	17D i.p [£]	16/19 (85%)	40-80
10	Vero/17D [§]	20/20 (100%)	10
	AcNPV [§]	1/19 (5%)	<10
	Ac-E.NS1 ⁺	25/25 (100%)	10
	Ac-E 1 [§]	17/19 (90%)	20
15	Ac-NS 1 [§]	5/25 (20%)	<10

(* : dilution du sérum pour obtenir 50% de réduction
du titre viral)

20 (£ : 10⁶ ufp de VFJ)

(§ : 0,5 x 10⁶ cellules infectées)

(+ : 2,5 x 10⁶ cellules infectées)

25 Les souris Swiss inoculées par le virus 17D
en intrapéritonéale ou celles qui ont reçu un lysat de
cellules Vero infectées par le virus 17D sont protégées
tandis que les souris immunisées par le lysat de
cellule Sf9 infectées par le baculovirus AcNPV sont
décédées 15 jours après le début de l'épreuve avec le
virus infectieux (Figure 6). Lorsque les souris Swiss
30 sont inoculées par le lysat cellulaire Ac-E.NS1, la
protection est totale.

Pour établir le rôle respectif de E et NS1
dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice
anti-virale, les souris Swiss ont reçu soit un lysat
de cellules infectées par le baculovirus recombinant

Ac-E1, soit un lysat de cellules infectées par le baculovirus recombinant Ac-NS1. Les souris immunisées contre la protéine E tronquée de son extrémité C terminale (virus Ac-E1) sont protégées contre le virus infectieux (Figure 7), celles immunisées contre la protéine NS1 (virus Ac-NS1) restant sensibles au VFJ à 80% malgré un retard de 2 jours dans l'apparition des signes cliniques par rapport aux souris ayant reçu seulement les protéines du baculovirus (virus AcNPV) (Figure 7). Cette protection faible (20%) mais réelle suggère que la protéine NS1 seule joue un rôle non négligeable dans l'immunité anti-virale.

c) présence d'anticorps dirigés contre les protéines E et NS1

Les sérums prélevés chez les souris immunisées avant l'injection du virus 17D en intracérébrale (J21) sont testés pour la présence d'anticorps dirigés contre les protéines E ou NS1. Par radioimmunoprécipitation d'un lysat de cellules Vero infectées par le VFJ et marquées à la méthionine [^{35}S], on confirme que les sérums de souris immunisées avec le baculovirus AcNPV ne réagissent avec aucune des protéines du VFJ. Les sérums de souris ayant reçu le virus 17D en i.p. ou les protéines des cellules Vero infectées par le VFJ immunoprécipitent avec des intensités variables les protéines E et NS1 (Figure 8).

Les sérums des souris immunisées avec le lysat de cellules Sf9 infectées par le virus Ac.E-NS1 immunoprécipitent très bien la protéine NS1 et dans une moindre mesure la protéine E du VFJ (Figure 8). Les sérums des souris immunisées avec le lysat de cellules Sf9 infectées par les virus Ac-E1 ou Ac-NS1 immunoprécipitent très faiblement ou pas avec les protéines E ou NS1 respectivement (Figure 8). Deux

hypothèses peuvent être proposées pour répondre à ce phénomène; soit les protéines recombinantes E et NS1 exprimées par le virus Ac-E.NS1 sont plus immunostimulantes que celles synthétisées respectivement par les virus Ac-E1 et Ac-NS1, soit les anticorps dirigés contre les protéines E et NS1 individualisées appartiennent à des classes d'isotypes qui réagissent très mal avec la protéine A qui est spécifique des Ig 2a. La deuxième explication peut être argumentée par le fait que le titre en Ac NI contre la protéine E exprimée par le virus Ac-E1 est supérieur à celui de la protéine E exprimée par le virus Ac-E.NS1 bien que rien ne soit détecté par immunoprécipitation; en définitif, on peut imaginer que les protéines E et NS1 synthétisées par le virus Ac-E1 et Ac-NS1 respectivement stimulent préférentiellement certaines classes d'immunoglobulines non reconnues par la protéine A, phénomène qui n'aurait pas lieu lorsque les protéines recombinantes sont exprimées par le virus Ac-E.NS1. la réponse antigénique semble différente pour les mêmes protéines selon leur mode de présentation au système immunitaire de l'animal.

Par le test de séroneutralisation in vitro, le titre en anticorps neutralisants (AcNI) présents dans les sérums a été utilisé. Le test de séroneutralisation in vitro est réalisé de la façon suivante; cent unités formant plages (ufp) du VFJ, souche vaccinale 17D-204 France, sont incubées pendant 2 heures avec des dilutions successives de sérums puis mises en contact avec des cellules de reins de porc (PS) en présence de carboxyméthylcellulose (CMC). Au bout de 5 jours, les cellules sont colorées et on détermine la dilution du sérum qui permet d'obtenir 50 plages environ soit une réduction de 50% du titre viral (titre du sérum en séroneutralisation). Le titre obtenu est de

40-80 pour les sérums de souris ayant reçu le virus 17D en i.p. et de 10 pour ceux des animaux immunisés contre le lysat de cellules Vero infectées par le VFJ (tableau 1). Comme attendu, on ne détecte pas d'Ac NI
5 dans les sérums de souris immunisées contre les protéines du baculovirus AcNPV ou contre la protéine recombinante NS1 exprimée par le baculovirus recombinant Ac-NS1 (titre <10). Les sérums de souris immunisées avec les baculovirus Ac-E.NS1 ou Ac-E 1 ont
10 des titres en anticorps neutralisants de 10 et 20 respectivement (tableau 1).

d) conclusion

Les protéines E et NS1 du virus de la fièvre
15 jaune, souche vaccinale 17D-204 France, exprimées par le baculovirus recombinant Ac-E.NS1 induisent une réponse immunitaire protectrice complète (100%) contre l'agent infectieux avec un titre en anticorps neutralisants de 10. La protéine d'enveloppe (E) délétée de
20 son domaine d'ancrage transmembranaire carboxylique exprimée par le virus Ac-E1, immunise efficacement contre le VFJ (90% de protection) avec un titre en Ac NI de 20. Si la protéine recombinante NS1 synthétisée par le virus Ac-NS1 n'induit pas une immunité protec-
25 trice efficace contre le VFJ (20% de protection), la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire thymo-dépendante induite par elle paraît retarder l'apparition des signes cliniques, (généralement une paralysie des membres inférieurs) et peuvent protéger
30 certains individus probablement en relation avec l'haplotype du complexe majeur d'histocompatibilité (C.M.H.) de la souris Swiss immunisée.

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la protéine d'enveloppe a un rôle primordial dans la réponse immunitaire protectrice anti-virale,

certainement par l'induction d'anticorps neutralisants. Cependant, il semblerait que la réponse immunitaire dirigée contre les protéines E et NS1 exprimées par le virus Ac-E.NS1 soit encore plus performante pour les raisons suivantes :

- existence d'une protection totale contre le VFJ après seulement deux injections espacées de 15 jours d'un simple lysat cellulaire;
- le taux en anticorps neutralisants (titre 10) est suffisant pour une complète protection antivirale (titre comparable à celui obtenu pour les souris protégées avec le lysat de cellules Vero infectées par le virus 17D);
- observation d'un haut pouvoir immunogène de la protéine NS1 produite par Ac-E.NS1.
- intervention des deux compartiments de l'immunité anti-virale protectrice, la séroneutralisation du virus et la cytotoxicité dirigée contre les cellules infectées, l'ensemble permettant une double protection contre la diffusion de l'agent pathogène dans l'organisme (par les AcNI) ainsi que pour prévenir l'apparition de mutants d'échappement aux anticorps neutralisants en bloquant précocement la réplication virale en bloquant précisément la replication virale par l'intervention d'une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire thymodépendante dirigée contre la protéine NS1.

Cette double réponse antigénique pourrait, dans le cas de la dengue, prévenir l'apparition de complications sévères telles que les fièvres hémorragiques qui ont été décrites être liées à la présence d'une immunité préexistante vis-à-vis d'un sérotype hétérologue du virus de la dengue.

L'utilisation d'un vaccin sous-unité composé des protéines recombinantes E et NS1 apparaît comme

une réponse efficace et originale pour le développement d'une prophylaxie anti-flavivirus ou anti-flavilike. Dans le cas de la fièvre jaune, on pourrait immuniser efficacement les enfants de moins de 6 mois, 5 ce qui n'est pas possible avec le vaccin vivant 17D actuel à cause de son niveau non négligeable de neurovirulence (recommandation de l'O.M.S.).

10

15

20

25

30

Symboles des acides amniés

	A	Ala	alanine
	C	Cys	cystéine
5	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
	H	His	histidine
10	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
	N	Asn	asparagine
15	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	serine
	T	The	thréonine
20	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

25

30

REFERENCES

1. Schlesinger, J.J. Brandriss, M.W. and Walsh, E.E.(1985). Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the non structural glycoprotein gp 48 and by active immunization with gp 48 J. Immunol. 135,2805-2809
2. Gould, E.A. Buckley, A. Barrett, A.D.T. and Cammack., N (1986). Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. J. Gen. Virol. 67,591-595
3. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New-York
4. Desprès, P., Ruiz-Linarès, A., Cahour, A., Girard, M., Wychowski C., and Bouloy, M. (1990). The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the yellow fever virus polyprotein precursor acts as a signal peptide. Virus Res. 16,59-76
5. Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1989). High level expression of non fused foreign genes with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors. Virology. 170, 31-39
6. Summers, M.D. and Smith, G.E. (1987). A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell cul-ture procedure. In : "Texas Agricultural

Experiment Station Bulletin" College Station TX, Bull.
n° 1555

- 5 7. Ruiz-Linarès, A., Cahour, A., Desprès, P., Girard, M. and Boloy, M. (1989). Processing of yellow fever virus polyprotein : role of cellular proteases in maturation of the structural proteins. J. Virol. 63, 4199-4209
- 10 8. Desprès, P., Cahour, A., Wychowski, C., Girard, M. and Bouloy, M. (1988). Expression of yellow fever virus envelope protein using hybrid SV40/yellow fever viruses. Ann.Inst.Pasteur/Virol.139,59-67
- 15 9. Gould, E.A., Buckley, A., Cammack, N. Barrett, A.D.T., Clegg, J.C.S., Ishak, R. and Varma, M.G.R. (1985). Examination of the immunological relationships between flaviviruses using yellow fever virus monoclonal antibodies. J.Gen.Virol.66:1369-1382
- 20 10. Schlesinger, J.J. Brandriss, M.W. and Monath, T.P. (1983). Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition and immune precipitation of the virus envelope. Virology.125.8-17
- 25 11. Schlesinger, J.J. Brandriss, M.W., Walsh, E.E., Eckels, K. Zhang, Y.M. and Lai, C.J. (1988). Development of candidate subunit flavivirus vaccines : immunogenic characterization of yellow fever and dengue virus structural and non structural proteins. In : "Technological Advances in Vaccine Development" (Alan R. Less, Inc.). pp 11-20
- 30 12. Cane, P.A. and Gould, E.A. (1989). Immunoblotting

- reveals differences in the accumulation of envelope protein by wild-type and vaccine strains of yellow fever virus. J.Gen.Virol. 70,557-564
13. Winkler, G. Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E. and Stollar, V. (1988). Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. Virology. 162, 187-196
14. Winkler, G., Maxwell, S.E., Ruebner, C., and Stollar, V (1989). Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. Virology.171,302-305
15. FAN, W. and MASON, P.W. (1990). Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA, Virology 177, 470-476
16. Schlesinger, J.J. Brandriss, M.W., Putnak, J.R. and Walsh E.E. (1990). Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1 : consequences of interaction with antibody J.Gen.Virol. 71,593-599
17. Desprès, P., Deubel, V., Bouloy, M. and Girard, M. (1986). Identification and characterization of intracellular yellow fever virus-specific RNA : absence of subgenomic-RNA. Ann.Inst. Pasteur/Virol.137E, 1 204
18. Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.H., Sheet R. and Strauss, J.H. (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus : implications for flavivirus gene expression and evolution. Science. 229, 726-733

19. Desprès, P., Cahour, A., Dupuy, A., Deubel, V.,
Bouloy, M. Digoutte, J.P. and Girard, M. (1987). High
genetic stability of the region coding for the struc-
tural proteins of yellow fever virus strain 17D;J.
5 Gen.virol. 68, 2245-2247
20. Hahn, Y.S., Dalrymple, J.M., Strauss, J.H. and
Rice, C.M. (1987). Comparison of the virulent Asibi
strain of yellow fever virus with the 17D vaccine
10 strain derived from it. Proc.Natl.Acad.Sci (USA) 84,
2019-2023
21. Dupuy, A., Desprès, P., Cahour, A., Girard, M and
Bouloy, M. (1989). Nucleotide sequence comparison of
15 the genome of two 17D-204 yellow fever vaccines.
Nucleic.Acids.Res.17, 3929
22. Jarvis, D.L. and Summers, M.D. (1989).
Glycosylation and secretion of human tissue plasmino-
20 gen activator in recombinant baculovirus-infected
insect cells.Mol.Cell. Biol.9, 214-223
23. Von Heijne, (1986), Nucleic Acids Research
(N.A.R), 14, 4683-4690.

25

30

REVENDECATIONS

- 1 - Baculovirus recombinant, caractérisé en ce qu'il comporte un ADNc codant pour tout ou partie de la protéine antigénique d'enveloppe E et/ou un ADNc
5 codant pour tout ou partie de la protéine antigénique non structurale NS1 d'un virus appartenant aux Flaviviridae ou d'un virus apparenté aux Flaviviridae, inséré dans le gène de la polyédrine entre le nucléotide + 35 et le nucléotide de + 170, le A du
10 codon d'initiation modifié de la polyédrine étant numéroté + 1.
- 2 - Baculovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou
15 partie de E ou un ADNc codant pour tout ou partie de E et NS1, et en ce qu'il comporte, en outre, en amont de l'ADNc une séquence leader qui correspond à l'extrémité 3' de la région 5' non codante du gène de la protéine VP1 du virus SV40 comportant 11 nucléotides
20 en 3' du site Hind III et le codon d'initiation ATG de la protéine VP1.
- 3 - Baculovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en tant que segment d'insertion un ADNc codant pour tout ou
25 partie de E, et en ce qu'il comporte, en outre, à l'extrémité 3' un codon de terminaison introduit préalablement à l'insertion dans le baculovirus.
- 4 - Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
30 qu'il est obtenu à partir de Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus.
- 5 - Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le virus appartenant aux Flaviviridae ou apparenté

aux Flaviviridae est le virus de la fièvre jaune (VFJ).

6 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-E.NS1 comprenant l'ADNc codant pour E et NS1 délétée de son aminoacide C terminal potentiel, caractérisé en ce qu'il est obtenu par les étapes suivantes :

a) digestion d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour E et NS1, afin d'introduire un codon de terminaison à l'extrémité carboxylique de NS1 de façon à ce que la protéine exprimée résultante soit délétée de son aminoacide C-terminal;

b) digestion de ce plasmide par Hind III et ou Bgl II;

c) traitement des extrémités avec le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate, de manière à rendre les extrémités franches;

d) digestion des ADN obtenus par Apa I;

e) isolement et ligation des fragments d'ADN obtenus avec le plasmide pVL 941-poly préalablement linéarisé avec Bam HI et traité par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate, puis par la phosphatase alcaline pour générer un plasmide comportant l'ATG initiateur de la protéine VP1 du virus SV40 précédé des 11 nucléotides adjacents en 5' délimités par un site Hind III.

7 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-NS1 comprenant l'ADNc codant pour la protéine NS1 délétée de son aminoacide C terminal potentiel, caractérisé en ce qu'il est obtenu par les étapes suivantes :

a) digestion d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour E et NS1 délétée de son aminoacide C terminal avec Xba I;

5 b) remplissage avec le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate et ligation des fragments obtenus pour générer un plasmide comportant une séquence leader correspondant à l'extrémité 3' de la région 5' non codante du gène de la protéine VP1 du virus SV 40 comportant les 11 nucléotides en 3' du site Hind III et le codon d'initiation ATG de la protéine VP1 ainsi que la séquence exogène GGG GGA TCC TCT AGC TAG en aval de l'ADNc codant pour E et NS1 délétée de son aminoacide C terminal;

10 c) digestion du plasmide obtenu à l'étape b) avec Tth III I, MluI et Pst I,

15 d) ligation des fragments obtenus à l'étape c) après remplissage du site Tth IIII par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate avec un vecteur de transfert pVL 941-poly obtenu à partir de pVL 941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI, digéré par Bam HI et remplissage du site Bam HI par le fragment de Klenow en présence des 4 désoxynucléotides triphosphate.

20 8 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-E1 comprenant l'ADNc codant pour le peptide signal de la protéine E suivie de la protéine E tronquée, délétée de son extrémité C terminale (aminoacides 286 à 720) , caractérisé en ce qu'il est obtenu par les étapes suivantes :

25 a) digestion du plasmide pAc-E.NS1 selon la revendication 6 par Xho I et Apa I et d'un plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNc codant pour la protéine E avec Apa I et Bgl II, et

30 b) ligation des fragments [Xho I - Apa I] du

plasmide pAc-E.NS1 obtenu précédemment et [Apa I - Bgl II] du plasmide recombinant SV40-VFJ comportant l'ADNC codant pour la protéine E tronquée avec un vecteur de transfert PVL 941-poly obtenu à partir de pVL 941 par
 5 insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI et digéré par Xho I et Bam H I.

9 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-E2 comprenant l'ADNC codant pour le peptide signal
 10 de la protéine E suivie de la protéine E tronquée, déléetée de son extrémité C terminale (aminoacides 286 à 720) est obtenu par les étapes suivantes :

a) création de sites Bam HI et Sma I aux extrémités des régions non codantes 5' et 3' respectivement de l'ADNC par mutagénèse dirigée par
 15 PCR (Polymérase Chain Reaction) au moyen de la Taq-polymérase à partir du plasmide pSV-E en utilisant comme amorces respectivement les oligodésoxynucléotides E-5' et E-3' de séquences :

20 E-5' : 5'GTCGACCTGTACGGATCCGTTACTTCTGCTCTA₃,

E-3' : 5'TCAATGATCACGCTAGTCCCGGGCAAGCTTCT

25 CTCT₃,
 la ligne en pointillés représentant respectivement les sites Bam HI et Sma I;

b) digestion de l'ADN obtenu à l'étape précédente par Bam HI et Sma I;

30 c) ligation des fragments d'ADN obtenus dans le plasmide pVL 941-poly obtenu à partir de pVL941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI, et digéré par Bam HI et Sma I pour obtenir un plasmide intermédiaire ;

d) substitution du fragment d'ADN compris

entre le site Hind III (nucléotide -13 dans la région 5' non codante du virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae et le site Pst-I (nucléotide 1964 du virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae) du
 5 plasmide intermédiaire par le fragment homologue du plasmide pSV-E..

10 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-EWNS1 comprenant l'ADNc codant pour la protéine E
 10 suivie de la protéine NS1 sous la forme d'une polyprotéine non clivée, caractérisé en ce qu'il est obtenu par mutagénèse dirigée, notamment par PCR de la séquence VXA (aminoacide 776 à 778), située en amont du premier aminoacide de NS1, dans laquelle X
 15 représente les aminoacides G, H ou Q notamment G, en FYV.

11 - Plasmide recombinant pour l'obtention d'un baculovirus selon la revendication 1, dénommé pAc-EANS1 comprenant l'ADNc codant pour la protéine E
 20 liée par une liaison de covalence à la protéine NS1 déletée de son aminoacide C terminal potentiel, caractérisé en ce qu'il est obtenu par les étapes suivantes :

a) création d'un site Sna BI unique en
 25 position 2450, (correspondant à la position entre les aminoacides 777 et 778), de l'ADNc par mutagénèse dirigée par PCR au moyen de la Taq-Polymérase à partir du plasmide pAc-E.NS1, tel que défini à la revendication 6, en utilisant comme amorces l'oligodésoxynucléotide SP-NS1 de séquence :

5' TCC GCA CTT GAC CTC TCT CTT GCC AAA GTT
 GAT GGC GCA TCC TTG ATC TAC GTA AAA TCC TAG AGA CAA

AAA CAT CAT GAT CAC TCC TA₃' ,

la ligne pointillée représentant les codons substitués

codant pour FYV, et l'oligodésoxynucloétide E-5' tel que défini à la revendication 9 ;

b) digestion de l'ADN obtenu par Bam HI et SacI ;

5

c) ligation dans le plasmide pVL 941-poly obtenu à partir de pVL 941 par insertion d'un multilinker à l'extrémité 3' du site Bam HI, et digéré par Bam HI et Sac I, de manière à obtenir un plasmide intermédiaire ;

10

d) ligation des fragments d'ADN suivants :

- [Bam HI-Eco RI] du plasmide pAc-E2, tel que défini à la revendication 9, correspondant à la protéine E tronquée ;

15

- [Eco RI - Sac I] du plasmide intermédiaire défini précédemment, correspondant aux aminoacides 720 et 790 du Virus appartenant à ou apparenté aux Flaviviridae, comprenant la mutagenèse dirigée FYV ;

20

- [Sac I-Sma I] du plasmide pAc-E.NS1 tel que défini à la revendication 6 correspondant à la protéine NS1, dans le plasmide pVL 941-poly obtenu comme décrit précédemment et digéré par Bam HI et Sma I.

12 - Baculovirus recombinant déposé à la CNCM le 21 mai 1991 sous le n° I-1097.

25

13 - Baculovirus recombinant déposé à la CNCM le 21 mai 1991 sous le n° I-1098.

14 - Polypeptides comprenant tout ou partie des protéines E et/ou NS1, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par un baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 12 à 13.

30

15 - Polypeptides comprenant tout ou partie des protéines E et/ou NS1, caractérisé en ce qu'il sont obtenus par propagation d'un baculovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 4 ou 12 à 13 dans des cellules de Spodoptera frugiperda.

16 - Procédé de diagnostic in vitro chez

l'homme ou chez l'animal, par mise en évidence des anticorps dirigés contre tout ou partie de la protéine E et/ou la protéine NS1 immunogène telle qu'obtenue par un baculovirus recombinant suivant l'une des revendications 1 à 4 ou 12 à 13, dans un prélèvement biologique de l'homme ou de l'animal dans lequel on met en contact la ou les protéines immunogènes E et NS1 avec le prélèvement biologique de l'homme ou de l'animal pouvant contenir lesdits anticorps et on révèle la présence des anticorps fixés.

17 - Trousse de diagnostic in vitro des infections causées par les Flaviviridae ou les virus apparentés aux Flaviviridae pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 16 comprenant tout ou partie de la protéine NS1 et/ou la protéine E immunogènes telle qu'obtenues par un baculovirus recombinant suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 12 à 13 et contenant, en outre, un anticorps spécifique d'un isotype d'immunoglobuline.

18 - Vaccin destiné au traitement et à la prévention des infections causées par les Flaviviridae ou les virus apparentés aux Flaviviridae chez l'homme ou chez l'animal, dans lequel l'agent vaccinant consiste en tout ou partie de la protéine E et/ou de la protéine NS1, obtenues par un baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 12 à 13.

19 - Anticorps monoclonal dirigé contre tout ou partie d'une protéine E et/ou NS1, obtenue par un baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 12 à 13.

1 / 10

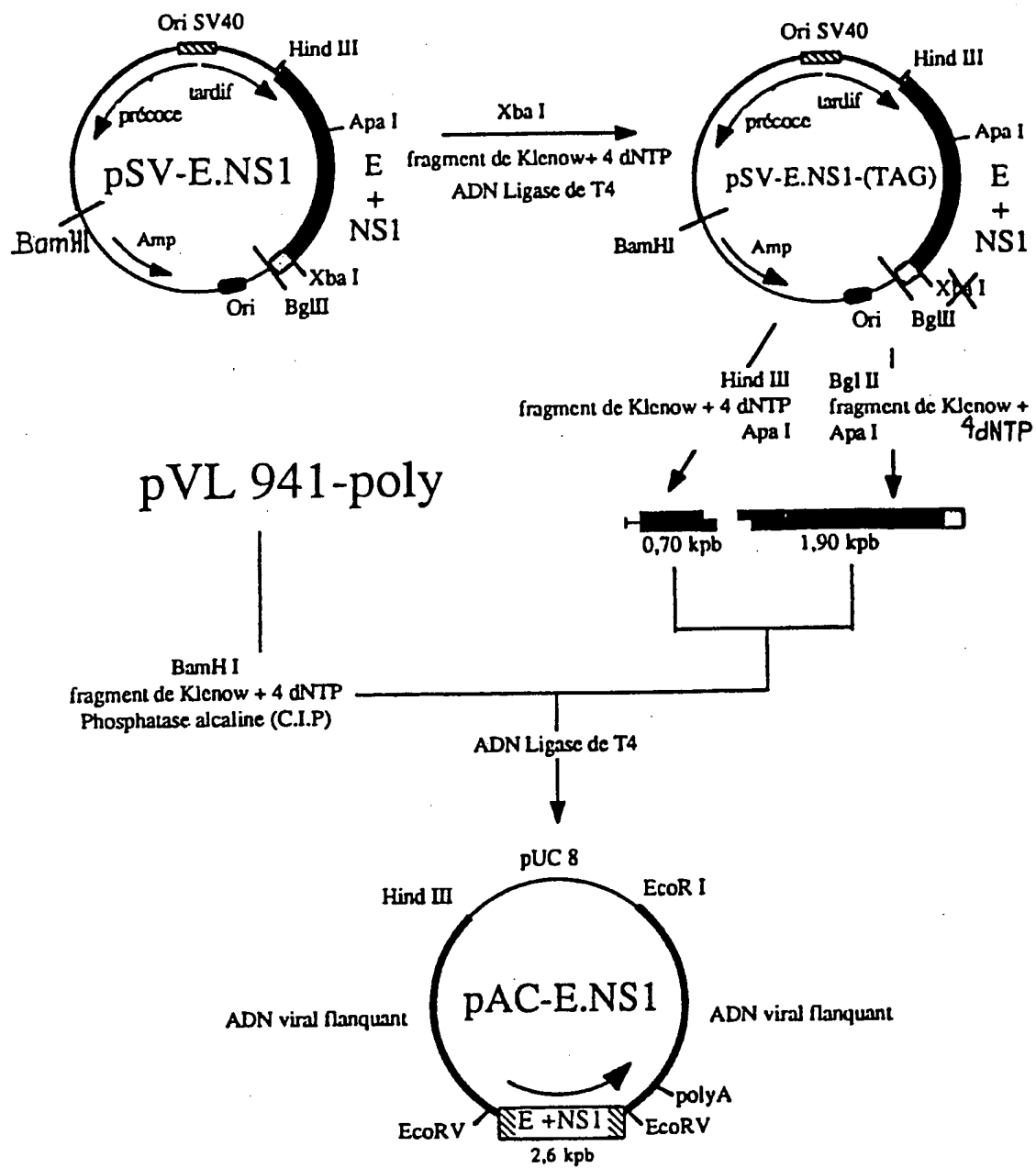
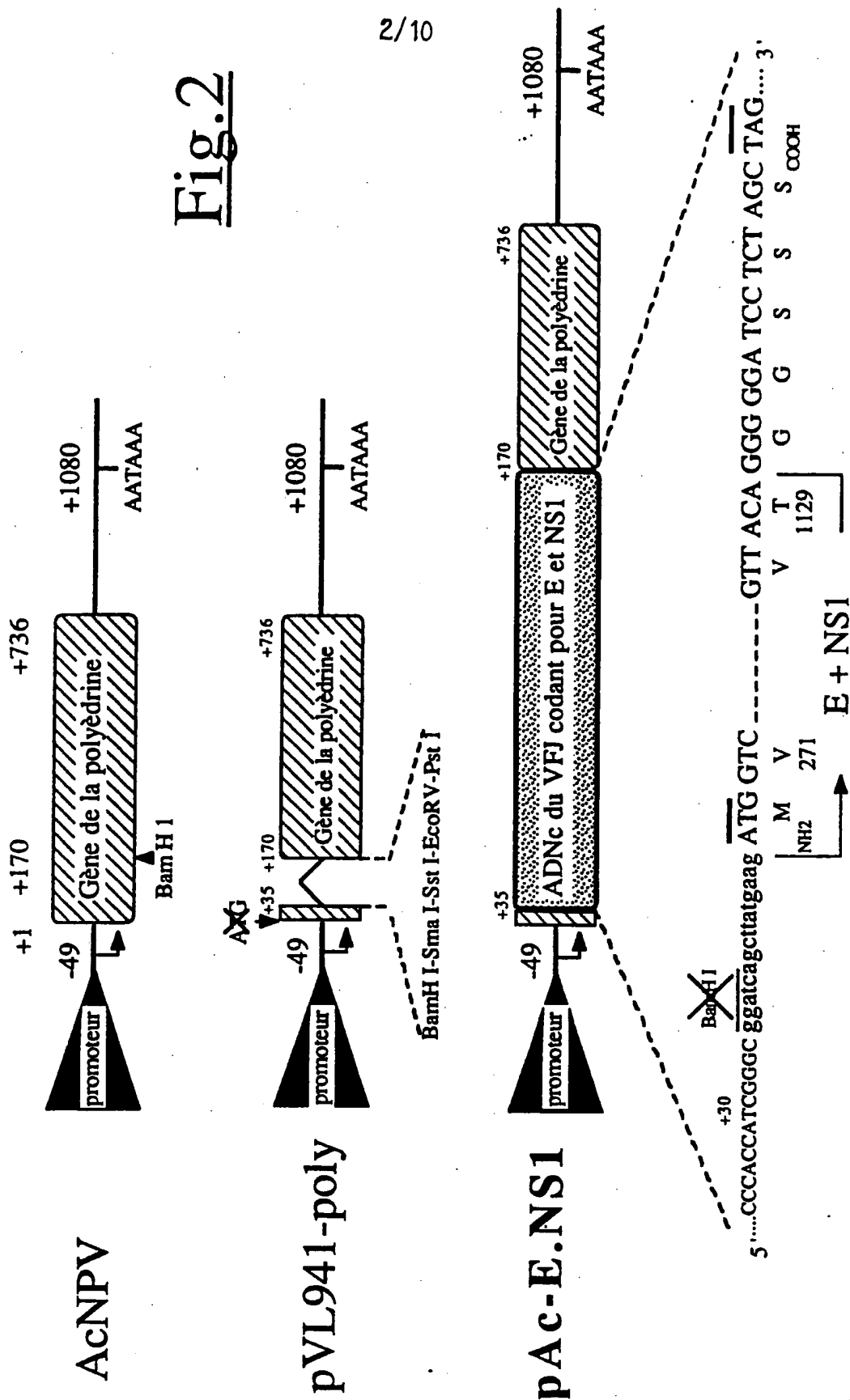


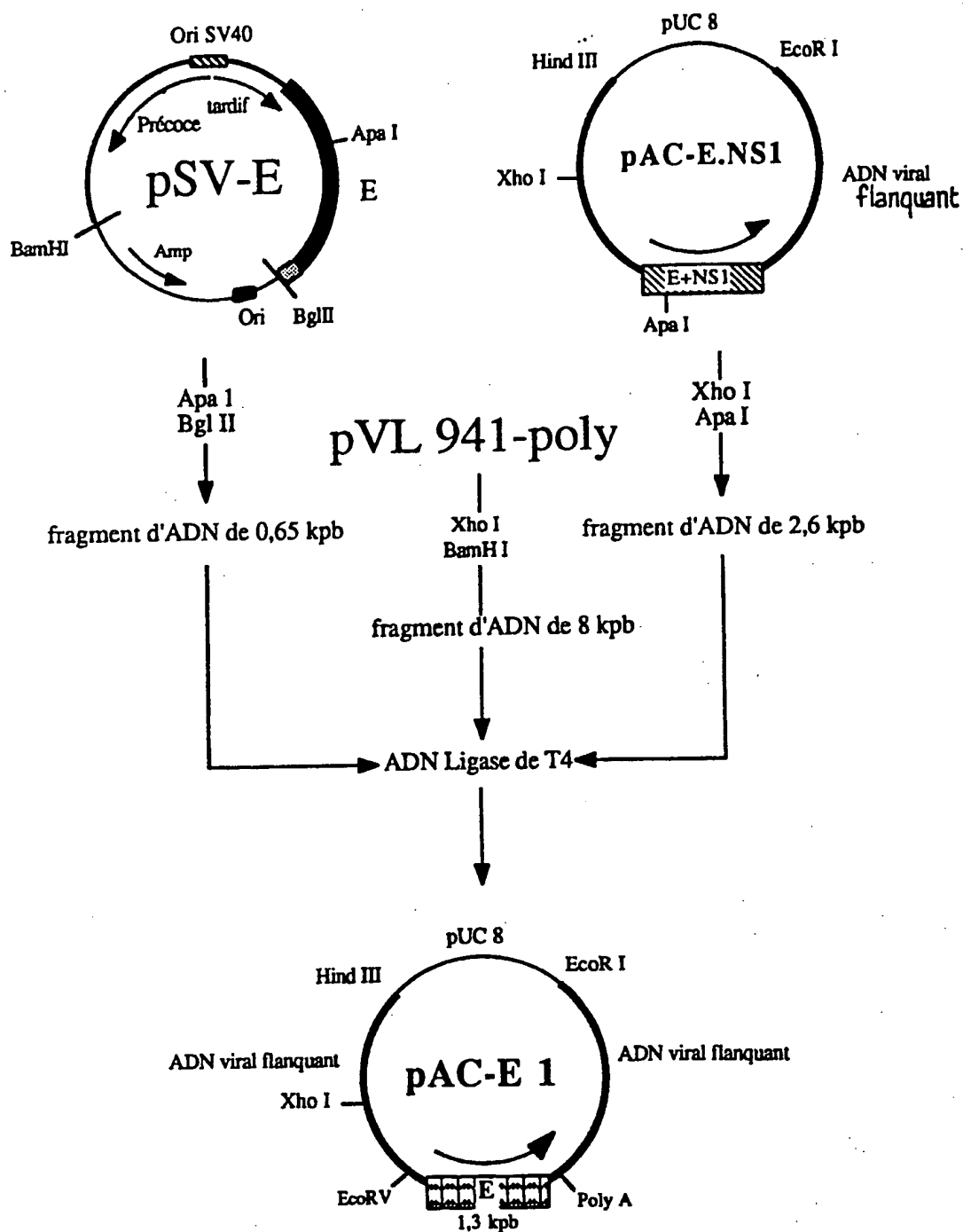
Fig.1

2/10

Fig.2



3 / 10

**Fig. 3****FEUILLE DE REMPLACEMENT**

4/10

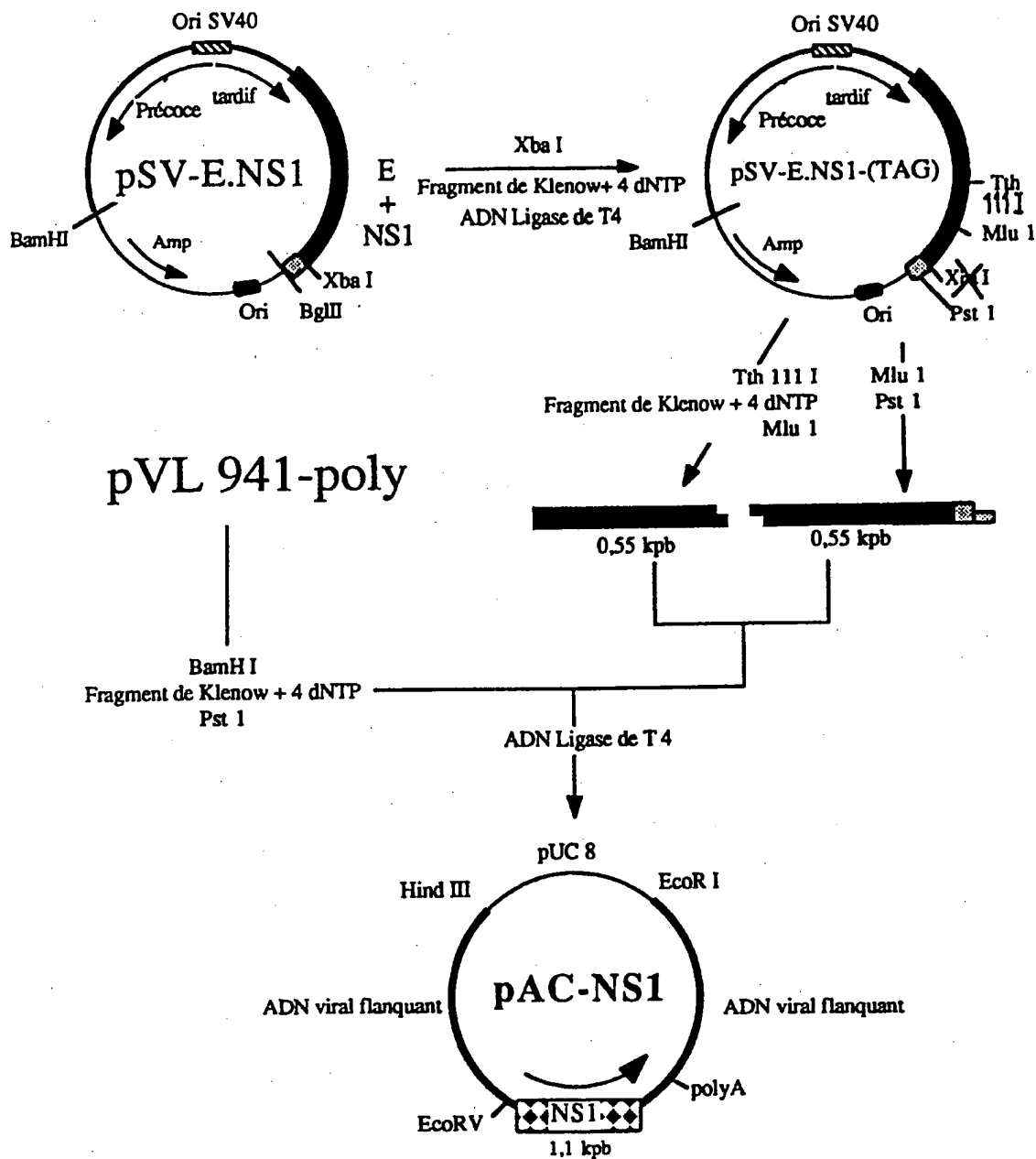
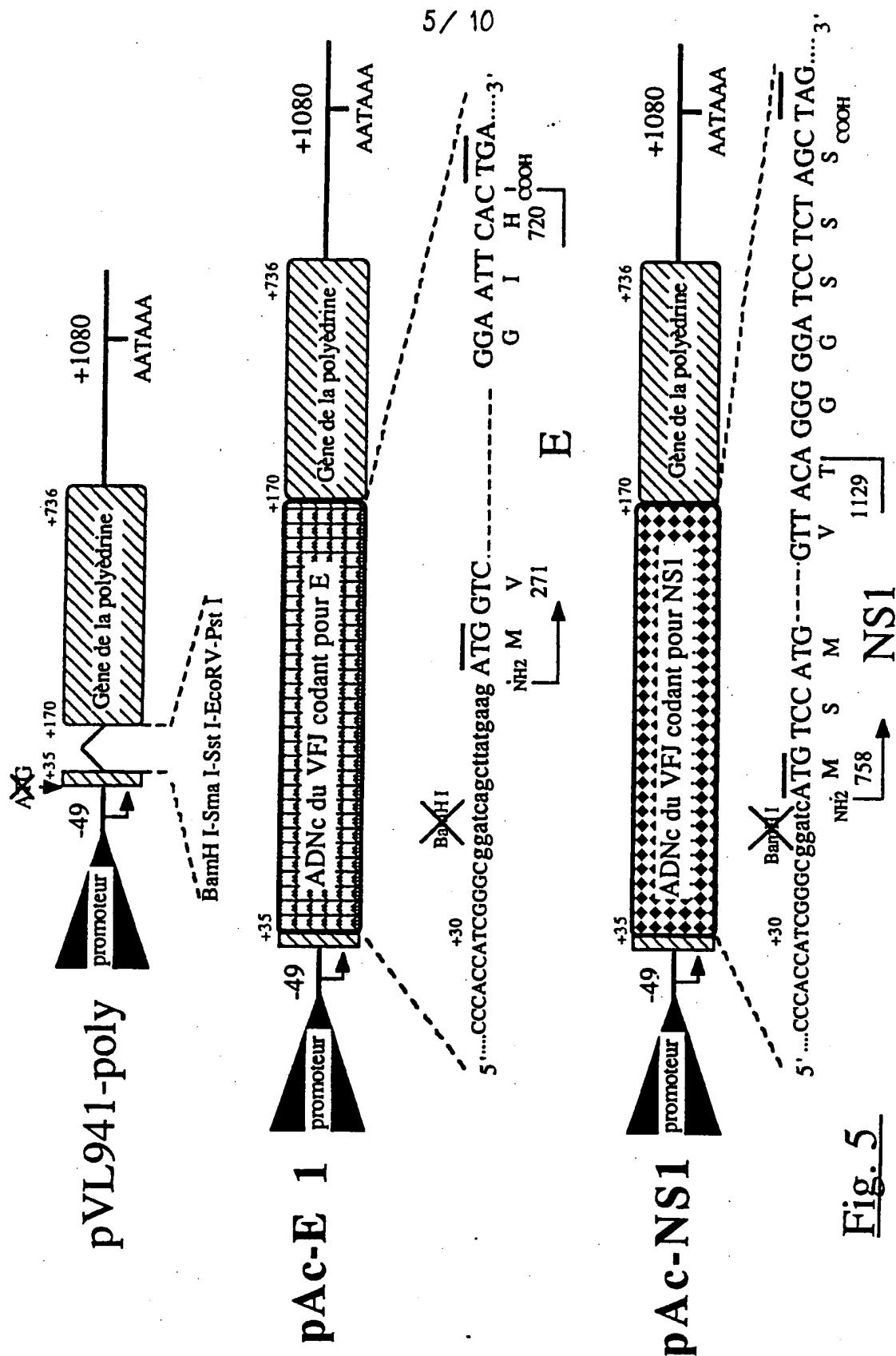


Fig. 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT



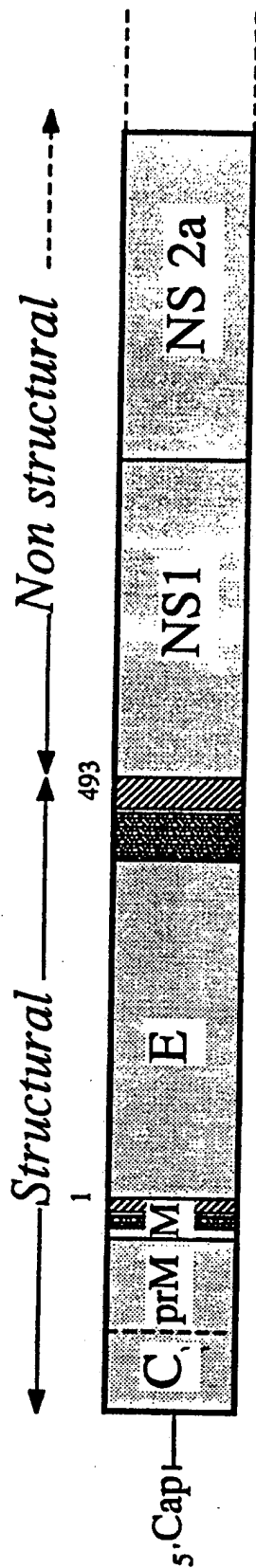


FIG. 6

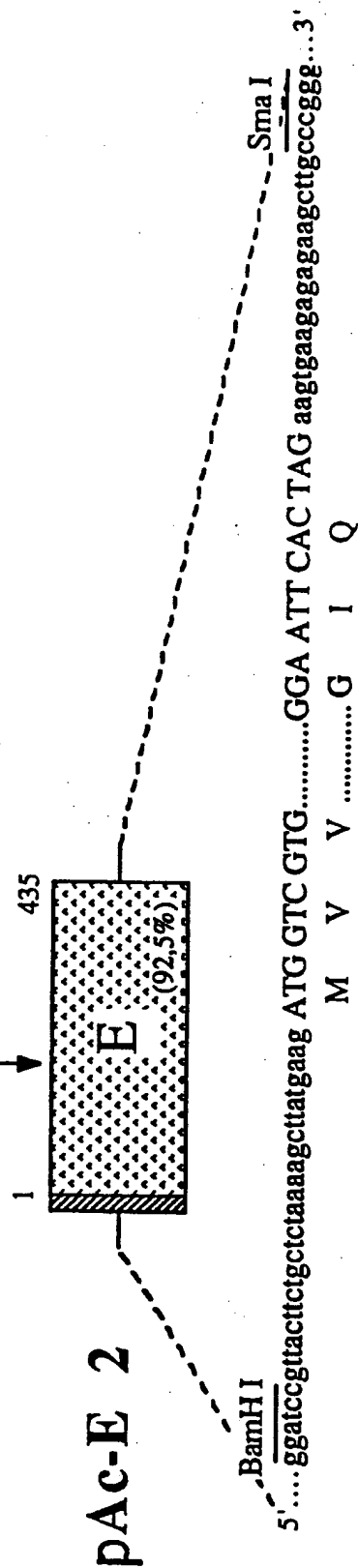
pSV-E

5' Primer BamH1 (E-5')
3' Primer Sma I (E-3')

a) P.C.R

b) Produit PCR digéré par BamH I et Sma I

c) Ligation avec pVL 941-poly linéarisé par BamH I et Sma I



8/10

Immunisations : AcNPV, 17D et Vero/17D

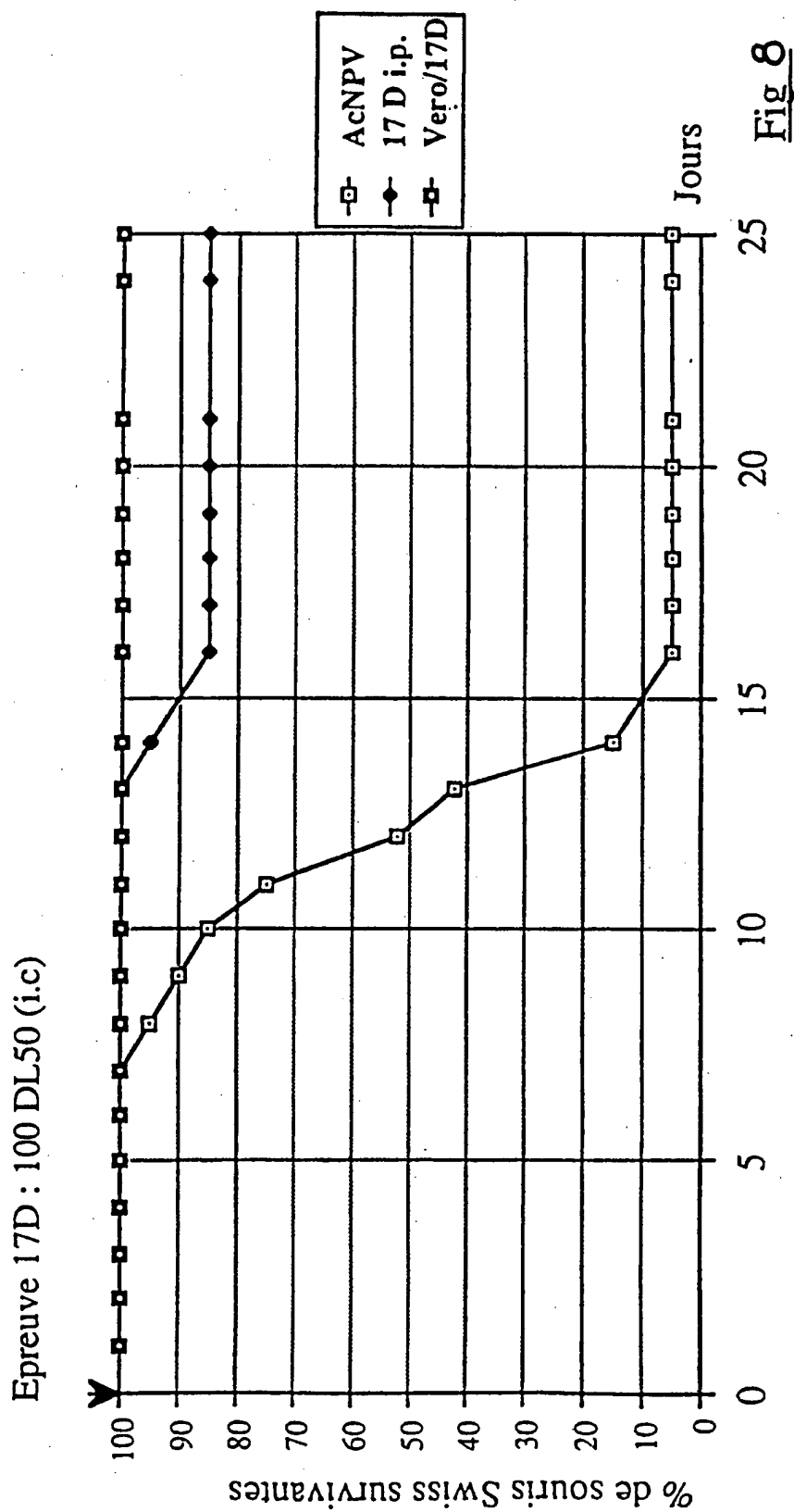


Fig 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9/10

Immunisations : AcNPV, Ac-E.NS1, Ac-EI et Ac-NS1.

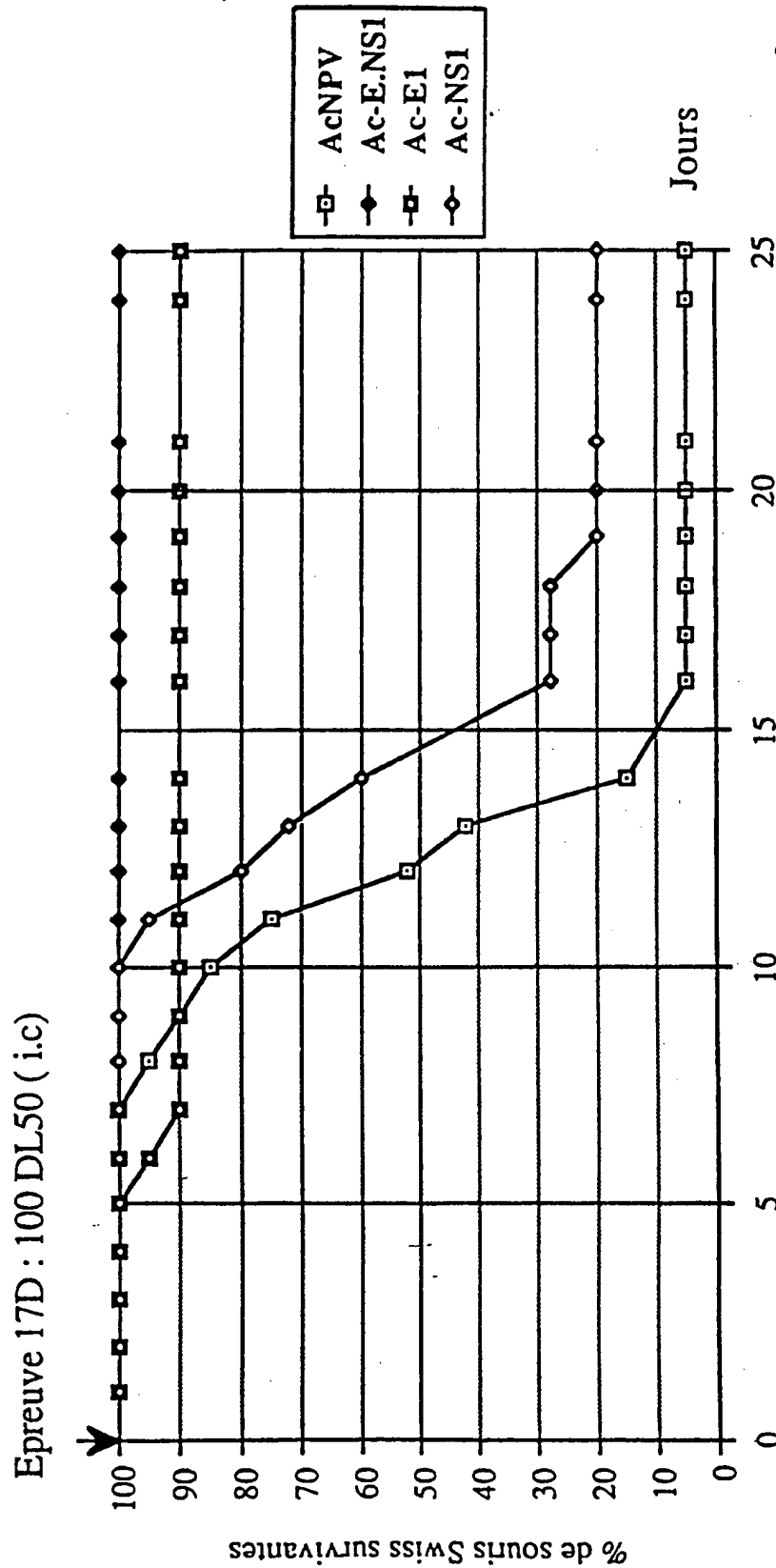
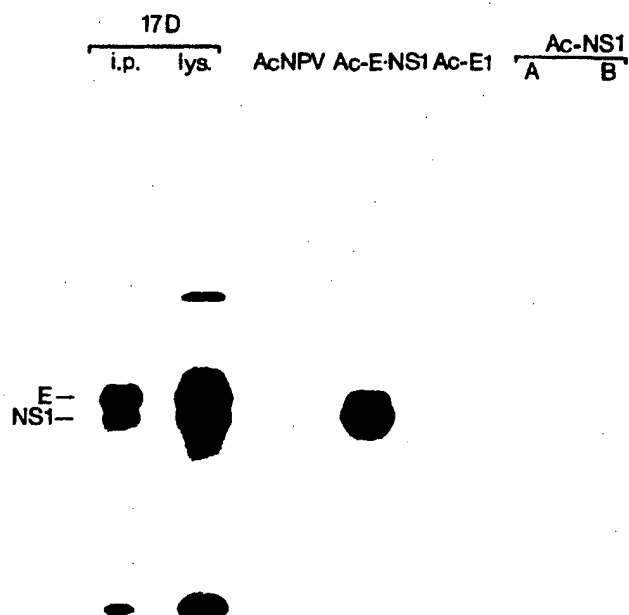


Fig.9

10 / 10

F I G . 1 0



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/FR 91/00432**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> Int.Cl.⁵ C07K13/00; C12N15/86; C12N15/40; A61K39/12 </div>														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C07K; C12N</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C07K; C12N								
Classification System	Classification Symbols													
Int.Cl. ⁵	C07K; C12N													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> VIROLOGY Vol. 170, 1989, pages 31 - 39; TUCKOW, V. & SUMMERS, M.D: "High level expression of non fused genes with Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus expression vector" see the whole document (cited in the application) </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 64, No. 6, June 1990, pages 2788 - 2795; YASUDA, A. et al.: "Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express preM and E glycoproteins of Japanes e Encephalitis Virus" see the whole document </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;"> <div style="margin-top: 20px;">./.</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">14-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	VIROLOGY Vol. 170, 1989, pages 31 - 39; TUCKOW, V. & SUMMERS, M.D: "High level expression of non fused genes with Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus expression vector" see the whole document (cited in the application)	1,4	Y	JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 64, No. 6, June 1990, pages 2788 - 2795; YASUDA, A. et al.: "Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express preM and E glycoproteins of Japanes e Encephalitis Virus" see the whole document	1,4	X	<div style="margin-top: 20px;">./.</div>	14-19
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
Y	VIROLOGY Vol. 170, 1989, pages 31 - 39; TUCKOW, V. & SUMMERS, M.D: "High level expression of non fused genes with Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus expression vector" see the whole document (cited in the application)	1,4												
Y	JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 64, No. 6, June 1990, pages 2788 - 2795; YASUDA, A. et al.: "Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express preM and E glycoproteins of Japanes e Encephalitis Virus" see the whole document	1,4												
X	<div style="margin-top: 20px;">./.</div>	14-19												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 26 July 1991 (26.07.91) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 23 August 1991 (23.08.91) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 26 July 1991 (26.07.91)	Date of Mailing of this International Search Report 23 August 1991 (23.08.91)	International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer								
Date of the Actual Completion of the International Search 26 July 1991 (26.07.91)	Date of Mailing of this International Search Report 23 August 1991 (23.08.91)													
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer													

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	VIROLOGY, Vol. 173, 1989, pages 674 - 682; MATSUURA, Y. et al.: "Characterization of Japanese Encephalitis Virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses" see the whole document	1,4
X	—	15-19
Y	AM. J. TROP. MED. HYG., Vol. 42, No. 5. 1990, pages 491 - 499; MCCOWN, J. et al.: "Protection of mice against lethal Japanese Encephalitis Virus with a recombinant baculovirus vaccine" see the whole document	1,4
X	—	14-19
Y	GB, A, 2226031 (NIPPON ZEON CO) 20 June 1990 see the whole document	1,4
X	—	14-19
Y	GB, A, 2218421 (NIPPON ZEON) 15 November 1989 see the whole document	1,4
X	—	14-19
X	VIRUS RESEARCH, Vol. 16, No. 1, April 1990, AMSTERDAM, NL, pages 59 - 76; DESPRES, P. et al.: "The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the Yellow Fever Virus polyprotein precursor act as a signa l peptide" see the whole document	14-19
A	see the whole document	9-11
X	JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 63, No. 10, October 1989, pages 4199 - 4209; RUIZ-LINARES, A. et al.: "Processing of Yellow Fever Virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins" see the whole document	14-19
A	see the whole document	9-11
	./.	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR/VIROLOGIE Vol. 139, No. 1, March 1989, Paris, F, pages 59 - 67; DESPRES; P. et al.: "Expression of the Yellow Fever Virus envelope protein using hybrid SV40/Yellow Fever Viruses", see the whole document	14-19
P,X	WO, A, 9102819 (MICROGENESYS INC.) 7 March 1991, see the whole document	1-4, 14-19

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

PCT/FR 91/00432
SA 48128

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 26/07/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2226031	20-06-90	JP-A- 2156896 FR-A- 2640144	15-06-90 15-06-90
GB-A-2218421	15-11-89	JP-A- 1285198 FR-A- 2631238	16-11-89 17-11-89
WO-A-9102819	07-03-91	None	

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 91/00432

I. CLASSIFICATION DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;"> CIB 5 C07K13/00 ; C12N15/86 ; C12N15/40 ; A61K39/12 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K ; C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹¹	No. des revendications visées ¹⁴
Y	VIROLOGY vol. 170, 1989, pages 31 - 39; LUCKOW, V. & SUMMERS, M.D: "High level expression of non fused genes with Autographa californica Nuclear Polyhydrosis Virus expression vector" voir le document en entier (cité dans la demande)	1, 4
Y	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 64, no. 6, juin 1990, pages 2788 - 2795; YASUDA, A. et al.: "Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express preM and E glycoproteins of Japanese Encephalitis Virus" voir le document en entier	1, 4
X	--- --- ---	14-19
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹¹ "Catégories spéciales de documents cités:"</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">26 JUILLET 1991</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">23.08.91</div>	
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">CHAM BONNET F.J.</div>	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	VIROLOGY vol. 173, 1989, pages 674 - 682; MATSUURA, Y. et al.: "Characterization of Japanese Encephalitis Virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses" voir le document en entier	1, 4
X	---	15-19
Y	AM. J. TROP. MED. HYG. vol. 42, no. 5, 1990, pages 491 - 499; MCCOWN, J. et al.: "Protection of mice against lethal Japanese Encephalitis Virus with a recombinant baculovirus vaccine" voir le document en entier	1, 4
X	---	14-19
Y	GB,A,2226031 (NIPPON ZEON CO) 20 juin 1990 voir le document en entier	1, 4
X	---	14-19
Y	GB,A,2218421 (NIPPON ZEON) 15 novembre 1989 voir le document en entier	1, 4
X	---	14-19
X	---	14-19
	VIRUS RESEARCH vol. 16, no. 1, avril 1990, AMSTERDAM, NL pages 59 - 76; DESPRES, P. et al.: "The 15 amino acid residues preceding the amino terminus of the envelope protein in the Yellow Fever Virus polyprotein precursor act as a signa l peptide" voir le document en entier voir le document en entier	9-11
A	---	14-19
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 10, octobre 1989, pages 4199 - 4209; RUIZ-LINARES, A. et al.: "Processing of Yellow Fever Virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins" voir le document en entier voir le document en entier	9-11
A	---	14-19
X	ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR/VIROLOGIE vol. 139, no. 1, mars 1989, PARIS, F pages 59 - 67; DESPRES, P. et al.: "Expression of the Yellow Fever Virus envelope protein using hybrid SV40/Yellow Fever Viruses" voir le document en entier	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,X	WO,A,9102819 (MICROGENESYS INC.) 07 mars 1991 voir le document en entier ---	1-4, 14-19

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

PCT/FR 91/00432
SA 48128

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

26/07/91

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-2226031	20-06-90	JP-A- 2156896	15-06-90
		FR-A- 2640144	15-06-90
GB-A-2218421	15-11-89	JP-A- 1285198	16-11-89
		FR-A- 2631238	17-11-89
WO-A-9102819	07-03-91	Aucun	

EPO FORM PWT2

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.